

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LORENI CARNEIRO DE SIQUEIRA KOVALHUK

ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PELO LAVADO E  
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA NASAL DE PACIENTES COM RINITE

CURITIBA

2014

LORENI CARNEIRO DE SIQUEIRA KOVALHUK

ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PELO LAVADO E  
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA NASAL DE PACIENTES COM RINITE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Alergologia e Imunologia Pediátrica.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto  
Rosário Filho

Co-orientador: Prof. Dr. José Ederaldo  
Queiroz Telles

CURITIBA

2014

K88 Kovalhuk, Loreni Carneiro de Siqueira  
Estudo comparativo do processo inflamatório pelo lavado nasal e análise histopatológica da mucosa nasal de pacientes com rinite [recurso eletrônico] / Loreni Carneiro de Siqueira Kovalhuk. – Curitiba, 2014.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho  
Coorientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles

1. Remodelação das vias aéreas. 2. Eosinófilos.  
3. Membrana basal. 4. Rinite alérgica. I. Rosário Filho, Nelson Augusto. II. Telles, José Ederaldo Queiroz. III. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WV 335

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA  
JORDÃO CRB 9/991

## FOLHA DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado  
em Saúde da Criança e do Adolescente*



# Parecer

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**, do Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após arguir a Doutoranda

*Loreni Carneiro de Siqueira Kovalchuk,*

em relação ao seu trabalho de Tese de Doutorado intitulado:

**“Estudo Comparativo do Processo Inflamatório Pelo Lavado Nasal e Análise Histopatológica da Mucosa Nasal de Pacientes com Rinite”**


é de parecer favorável à *Aprovação* da acadêmica, habilitando-a ao título de

*Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente,*

Área de concentração em *Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica.*


Curitiba, 17 de dezembro de 2014.

  
**Professor Nelson Augusto Rosário Filho**  
UFPR, Orientador e Presidente da Banca Examinadora.

  
**Professor Álvaro Augusto Souza da Cruz Filho**  
UFPA, Primeiro Examinador.

  
**Professor Herton Coifman**  
UFPR, Segundo Examinador.

  
**Professor Herberto José Chong Neto**  
UFPR, Terceiro Examinador.

  
**Professor Sérgio Osamu Toshii**  
UFPR, Quarto Examinador.

  
**Professora Moníca Nunes Lima**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação - Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente

Rua: General Carneiro, 181 - 14º. andar - Alto da Glória - Curitiba - PR - CEP 80060-900  
Coordenação: (041) 3360-1863 - e-mail: [monica.lima.ufpr@gmail.com](mailto:monica.lima.ufpr@gmail.com) Secretaria: (041) 3360-7980 - e-mail: [pgadped@hc.ufpr.br](mailto:pgadped@hc.ufpr.br) - [clara.lara@ufpr.br](mailto:clara.lara@ufpr.br)



## DEDICATÓRIA

“Você pode sonhar, criar e construir a  
ideia mais maravilhosa do mundo, mas  
são necessárias pessoas para  
transformar o sonho em realidade...”

*Walt Disney*

Dedico esta conquista a todas as pessoas  
que direta ou indiretamente contribuíram  
para realização deste estudo  
Dedico em especial ao meu marido  
Saulo Kovalhuk, por estar sempre ao  
meu lado

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Zaki Akel Sobrinho, pela oportunidade de prosseguir na formação acadêmica.

Agradeço especialmente ao meu orientador o Prof. Dr Nelson Augusto Rosário Filho, seus ensinamentos foram cruciais para elaboração deste estudo, admiro sua dedicação e dinamismo, são um incentivo a prosseguir no desenvolvimento da pesquisa e do aprendizado.

Ao meu Co-orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles pelo auxílio na revisão e execução de etapas fundamentais deste estudo e pela pronta disponibilidade de seu precioso tempo, o meu muito obrigado.

À Profa. Dra. Mônica Nunes Lima, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio na análise e interpretação estatística, mas especialmente pela sua receptividade.

Aos professores da Universidade Federal do Paraná e em especial aos professores do Departamento de Pediatria pelos sólidos ensinamentos que nortearam minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Carlos Antonio Riedi com o qual pude compartilhar tantas dúvidas e na sua simplicidade e dedicação tão amplas quanto sua sabedoria, o meu muito obrigado.

Ao Programa de Saúde da Criança e do Adolescente e seus professores e funcionários, agradeço pelo voto de confiança e por propiciarem a realização do presente estudo.

À Fundação Araucária pela aprovação do projeto e fornecimento do recurso necessário para compra dos materiais utilizados na pesquisa.

À equipe de Médicos Residentes do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas – UFPR e ao Dr. Marcos Mocelin, pela colaboração na seleção dos pacientes e coleta do material para o estudo.

À equipe de Médicos Residentes do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas – UFPR, pela colaboração no encaminhamento das amostras do estudo.

À equipe da Seção de Virologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas – UFPR, Ciyete Santos Silveira, Luine Rosele Renaud Vidal, Meri Bordignon Nogueira e Dra Sônia Mara Raboni, que gentilmente me acolheram e cederam o uso da estrutura e equipamentos para realização da análise do material.

À toda equipe do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas – UFPR, pela disponibilização da estrutura e uso dos equipamentos.

À equipe do Laboratório de Histologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas – UFPR, Marcos César Alves, Maurício de Oliveira e Lucilene Padeski, pelo prestativo auxílio na preparação do material.

À equipe da Seção de Imunopatologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas – UFPR, especialmente Renato Nisihara e Shirley Utyama, pelo auxílio na execução da determinação dos mediadores.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, meu especial agradecimento pela confiança e cuja colaboração foi fundamental para realização da pesquisa.

Aos amigos e familiares que me apoiaram, compreenderam minhas ausências e me deram força para seguir em frente.

## EPÍGRAFE

*Aprender é única coisa de que a mente nunca se  
cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende*  
*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

Inflamação crônica e alteração estrutural das vias aéreas superiores, refletem um processo generalizado de remodelamento, que inclui também vias aéreas inferiores, embora ocorra em menor extensão na mucosa nasal. Extensão de lesão epitelial na rinite alérgica (RA) e não alérgica (NAR) e associação com alterações inflamatórias no lavado nasal (LN) ainda não está de todo esclarecida. Os objetivos foram comparar pacientes com rinite alérgica e não alérgica, quanto a gravidade de sintomas e sinais de rinite, a relação entre o processo inflamatório na luz da cavidade nasal e extensão de lesão epitelial e espessamento da membrana basal (EMB) da mucosa nasal, além de verificar o ponto de corte do percentual de eosinófilos nas amostras de lavado nasal, que diferencia a presença de atopia. Foram incluídos pacientes com idade entre 14 e 58 anos e diagnóstico de RA (n = 36) e NAR (n = 20). Nos atópicos o teste cutâneo alérgico foi positivo para *D. pteronyssinus* em 35 (97,0%) e *L. perenne* em 18 (50,0%). A contagem total e diferencial de células foi feita pela citologia quantitativa do LN. Foram mensuradas as concentrações de albumina e de IL-8 no sobrenadante do LN. À avaliação histopatológica pela coloração Hematoxilina-Eosina, da mucosa do corneto inferior, foram graduados a extensão da lesão epitelial e o espessamento de membrana basal (EMB). Análise estatística para comparação de diferenças entre contagem de células foi feita pelo teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos e teste exato de Fisher para comparação de diferenças de frequências. A mediana de idade foi de 24,5 anos. Atópicos apresentaram maior índice de escore clínico de rinite em comparação a não atópicos, respectivamente com mediana de 9(1-18) e 6,5(0-12). A contagem total de células, neutrófilos e níveis de albumina e IL-8, não foi diferente no LN de atópicos e não atópicos. A mediana da contagem de eosinófilos no fluido nasal (ECNF) foi maior em RA (3%) do que em NAR (1%). O melhor ponto de corte da ECNF na distinção de RA e NAR foi de 4%. ECNF foi  $\geq 4\%$  em 44% dos atópicos em comparação a 20% dos não atópicos. Neste ponto a probabilidade de atopia foi 80%, com 44% de sensibilidade e 90% de especificidade. Algum grau de lesão epitelial foi mais frequente em RA (94%) do que em NAR (65%). Os resultados foram agrupados de acordo com a presença de EMB, como marcador de remodelamento. As principais diferenças encontradas no LN dos pacientes sem EMB foram maior contagem de neutrófilos (47,5%) em atópicos, em comparação à de neutrófilos (12%) em não atópicos. Por outro lado, na presença de EMB, não houve diferença no LN de pacientes com RA e NAR. À análise dentro de cada grupo, mostrou que entre não atópicos com EMB, a contagem de neutrófilos no LN foi maior (45%) em comparação aos não atópicos sem EMB (12%). Portanto, nesta casuística, 4% foi o ponto de corte do número de eosinófilos no LN, com maiores índices de sensibilidade e especificidade na diferenciação de pacientes atópicos. Apesar das diferenças nos mecanismos de reação inflamatória em rinite, remodelamento da via aérea, medido pelo EMB, resultou em semelhante infiltrado de células inflamatórias no LN, independente de atopia.

**Palavras chaves:** Eosinófilo. Membrana Basal. Remodelamento da Via Aérea. Rinite Alérgica.

## ABSTRACT

Chronic inflammation and structural changes in upper airways reflect the entire airway remodeling process including lower airways, although occurring in less extension in the nasal mucosa. The extent of epithelial damage in allergic (AR) and nonallergic rhinitis (NAR) and its association to inflammatory changes in nasal wash (NW) is not fully understood. Objective: Compare level of symptoms and signs of rhinitis in atopic and non atopic patients, investigate the relationship of inflammatory cells in NW and the level of epithelial damage and basement membrane thickening (BMT) of the airway mucosa, as well to determinate the best cut-off value of eosinophils in nasal fluid (NF) to discriminate atopic patients. Methods: Were included patients with AR (n=36) and NAR (n=20), between 14 and 58 years. Atopic patients reacted to skin prick test to *D.pteronyssinus* (35/97%) and *L.perenne* (18/50%). Total and differential cell counts were evaluated by a quantitative method of nasal cytology; albumin and IL-8 concentration were determined in the supernatant of NW. The damage to the epithelium and BMT were assessed by histopathological study of inferior turbinate mucosa, on Hematoxylin-Eosin stained sections, by staging system. Statistical analysis was performed by nonparametric Mann-Whitney U test for comparison between cell counts and differences in frequencies by Fisher exact test. Results: The median age was 24.5y. Clinical score of rhinitis was higher in AR compared to NAR, respectively 9(1-18) and 6.5(0-12). Total cell and neutrophil counts, as albumin and IL-8 levels were not different in NW of AR and NAR patients. Median of eosinophil count in nasal fluid (ECNF) was higher in AR (3%) than in NAR (1%). The best cut-off value of ECNF in distinguishing AR from NAR was 4%. ECNF was  $\geq 4\%$  in 44% of AR compared to 20% in NAR, at this point the probability of atopy was 80%, with 44% sensitivity and 90% specificity. Epithelial damage was more frequent in AR (94%) than in NAR (65%). The results were grouped according to the presence of BMT, as a sign of remodeling. The main differences observed in NW of patients without BMT were a higher median count of neutrophils (47.5%) in AR compared to neutrophils (12%) in NAR. Otherwise, in the presence of BMT, there were no differences in the NW of AR and NAR patients. The intragroup analysis showed that neutrophil count was higher in NW of NAR patients with (45%) than without (12%) BMT. Conclusions: The best cut-off value to differentiate atopic patients was 4% of ECNF. Despite of differences in the mechanisms of inflammatory reactions in rhinitis, airway remodeling measured by BMT resulted in a similar infiltrate of cells in NW, regardless of atopy.

**Keywords:** Airway Remodeling. Allergic Rhinitis. Basement Membrane. Eosinophil.

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CONTAGEM DIFERENCIAL DE EOSINÓFILOS E NEUTRÓFILOS NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS .....	65
GRÁFICO 2 – NÍVEL DE ALBUMINA ( $\mu\text{g/mL}$ ) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS .....	67
GRÁFICO 3 – NÍVEL DE IL-8 ( $\text{pg/mL}$ ) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS .....	68
GRÁFICO 4 – FREQUÊNCIA DOS CASOS DISTRIBUÍDOS POR FAIXAS DE PERCENTUAL DE NÚMERO DE EOSINÓFILOS NO LAVADO NASAL .....	70
GRÁFICO 5 – CURVA ROC – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO LAVADO NASAL PARA O DIAGNÓSTICO DE ATOPIA .....	71
GRÁFICO 6 – PROBABILIDADE DE ATOPIA DE ACORDO COM A CONTAGEM PERCENTUAL DE EOSINÓFILOS NO LAVADO NASAL .....	71
GRÁFICO 7 – EOSINÓFILOS (%) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DE ACORDO COM LESÃO EPITELIAL E ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL .....	85
GRÁFICO 8 – NEUTRÓFILOS (%) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DE ACORDO COM LESÃO EPITELIAL E ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL .....	86
GRÁFICO 9 – NÚMERO DE EOSINÓFILOS E NEUTRÓFILOS (%) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS COM ESCORE DE OBSTRUÇÃO NASAL DE MODERADA A GRAVE INTENSIDADE .....	89

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DA RINITE ALÉRGICA .....	25
FIGURA 2 – ETAPAS DO LAVADO NASAL E ANÁLISE DO SEDIMENTO .....	50
FIGURA 3 – IMAGENS DE LÂMINAS DE LAVADO NASAL CITOCENTRIFUGADO DE PACIENTE NÃO ATÓPICO COM RINITE, PRESENÇA DE CÉLULAS EPITELIAIS (PONTA DE SETA) E DE NEUTRÓFILOS (SETA CURVA).....	63
FIGURA 4 – IMAGENS DE LÂMINAS DE LAVADO NASAL CITOCENTRIFUGADO DE PACIENTE ATÓPICO COM RINITE, PRESENÇA DE CÉLULAS MONONUCLEARES (SETA ESTREITA), NEUTRÓFILOS (SETA CURVA) E EOSINÓFILOS (SETA CHEIA) .....	64
FIGURA 5 – EPITÉLIO PSEUDOESTRATIFICADO COLUNAR CILIADO, INFILTRADO NO CÓRION/LÂMINA PRÓPRIA PREDOMINANTEMENTE MONONUCLEAR LINFOPLASMOCITÁRIO, PRESENÇA DE GLÂNDULAS SEROSAS E MUCOSAS.....	74
FIGURA 6 – EPITÉLIO PSEUDOESTRATIFICADO COLUNAR CILIADO, PRESENÇA DE CÉLULAS CALICIFORMES, DESTAQUE PARA LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS .....	75
FIGURA 7 – EPITÉLIO TRANSICIONAL ESCAMOSO NÃO QUERATINIZADO, PRESENÇA DE GLÂNDULAS SEROSAS E MUCOSAS .....	75
FIGURA 8 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 0 (EPITÉLIO INTACTO) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 0 (NÃO VISUALIZADA); DESTAQUE PARA INTEGRIDADE DOS CÍLIOS.....	76
FIGURA 9 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 1 (AUSÊNCIA DE CÍLIOS) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 0 (NÃO VISUALIZADA).....	76



FIGURA 10 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 1 (AUSÊNCIA DE CÍLIOS) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 1 (MEMBRANA BASAL VISÍVEL, ESPESSURA INFERIOR OU IGUAL A 20µm)...77

FIGURA 11 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 1 (AUSÊNCIA DE CÍLIOS) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 2 (MEMBRANA BASAL VISÍVEL, ESPESSURA SUPERIOR A 20µm) .....77

FIGURA 12 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 2 (EROSÃO DA CAMADA SUPERIOR DE CÉLULAS, CAMADA DE CÉLULAS BASAIS INTACTA) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 1 (MEMBRANA BASAL VISÍVEL, ESPESSURA INFERIOR OU IGUAL A 20µm); DESTAQUE PARA INFILTRAÇÃO DE EOSINÓFILOS .....78

FIGURA 13 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 2 (EROSÃO DA CAMADA SUPERIOR DE CÉLULAS, CAMADA DE CÉLULAS BASAIS INTACTA) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 2 (MEMBRANA BASAL VISÍVEL, ESPESSURA SUPERIOR A 20µm) .....78

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1– CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	58
TABELA 2 - FREQUÊNCIA DOS CASOS PELA PONTUAÇÃO DE SINTOMAS DE RINITE EM ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS .....	60
TABELA 3 - FREQUÊNCIA DOS CASOS PELA PONTUAÇÃO DE SINAIS DE RINITE EM ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS .....	61
TABELA 4 - CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS E NÍVEIS DE ALBUMINA E IL-8 NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS .....	62
TABELA 5 - CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS NO LAVADO NASAL DOS PACIENTES COM MENOR PONTUAÇÃO DO ESCORE DE SINTOMAS PRURIDO/ESPIRROS (0 – 1).....	66
TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS POR FAIXAS DE NÚMERO DE EOSINÓFILOS NA SECREÇÃO NASAL .....	69
TABELA 7 - FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE ACORDO COM GRAU DE LESÃO EPITELIAL E ESPESSAMENTO DE MEMBRANA BASAL.....	72
TABELA 8 - FREQUÊNCIA DOS CASOS AGRUPADOS PELO GRAU DE LESÃO EPITELIAL E DE ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL EM ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS .....	74
TABELA 9 - GRAU DE LESÃO EPITELIAL EM RELAÇÃO A CELULARIDADE, NÍVEIS DE ALBUMINA E IL-8 NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS.....	80
TABELA 10 - GRAU DE LESÃO EPITELIAL EM RELAÇÃO A CONTAGEM DIFERENCIAL ABSOLUTA E RELAÇÃO EOSINÓFILO/NEUTRÓFILO NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS .....	81

TABELA 11 - GRAU DE ESPESSAMENTO DE MEMBRANA BASAL EM  
RELAÇÃO A CELULARIDADE, NÍVEIS DE ALBUMINA E DE IL-8 NO LAVADO  
NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS.....83

TABELA 12 - GRAU DE ESPESSAMENTO DE MEMBRANA BASAL EM  
RELAÇÃO A CONTAGEM DIFERENCIAL ABSOLUTA E RELAÇÃO  
EOSINÓFILO/NEUTRÓFILO NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO  
ATÓPICOS.....84

TABELA 13 - FREQUÊNCIA DOS CASOS CATEGORIZADOS PELA MEDIANA  
DA CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS DO LAVADO NASAL EM RELAÇÃO AO  
GRAU DE ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL DE ATÓPICOS E NÃO  
ATÓPICOS.....87

TABELA 14 – CELULARIDADE E NÍVEIS DE ALBUMINA E DE IL-8 NO  
LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS COM OBSTRUÇÃO  
NASAL DE MODERADA A GRAVE INTENSIDADE(†).....88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC	- <i>Area Under Curve</i>
CQLN	- Citologia quantitativa do lavado nasal
<i>D. pteronyssinus</i>	- <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der p 1	- Subgrupo de alérgenos do tipo 1 provenientes do ácaro da poeira doméstica <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ECM	- Extracellular matrix (Matriz extracelular)
ECNF	- <i>Eosinophil count in nasal fluid</i> (Contagem de eosinófilos no fluido nasal)
ECP	- <i>Eosinophil cationic protein</i> (Proteína catiônica eosinofílica)
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FN	- Fluido do lavado nasal
GM-CSF	- <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Fator estimulador de colônia granulócito-monócito)
HE	- Hematoxilina-eosina
ICAM-1	- <i>Intercellular adhesion molecule-1</i> (Molécula de adesão intercelular – 1)
IFN- $\gamma$	- Interferon- $\gamma$
IgE	- Classe de imunoglobulina do tipo E
IL-17	- Interleucina 17
IL-4	- Interleucina 4
IL-5	- Interleucina 5
IL-8	- Interleucina 8
ISAAC	- <i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> (Estudo Epidemiológico Internacional sobre Asma e Alergias na Infância)
LTs	- Leucotrienos
<i>L. perenne</i>	- <i>Lolium perenne</i>
MMPs	- <i>Matrix metalloproteinases</i> (Metaloproteinases da matriz)
MPO	- Mieloperoxidase
NAC	- <i>Nasal allergen challenge</i> (Provocação nasal com alérgeno)
NAR	- Rinite não alérgica

NARES	- <i>Non-allergic rhinitis with eosinophils</i> (Rinite não alérgica eosinofílica)
PAS	- <i>Periodic Acid-Schiff</i>
PD-ECGF	- <i>Platelet-derived endothelial cell growth factor</i> (Fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas)
PNAR	- <i>Perennial non allergic rhinitis</i> (Rinite não alérgica persistente)
RA	- Rinite alérgica
ROC	- <i>Receiver Operation Curve</i>
TGF- $\beta$	- <i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Th2	- Linfócitos T auxiliares do tipo 2
TIMPs	- <i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> (Inibidores tissulares das metaloproteinases)
VEGF	- <i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)
VMR	- Rinite vasomotora

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1 OBJETIVOS .....	23
1.2 JUSTIFICATIVA .....	23
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
3.1 TIPO DE ESTUDO .....	42
3.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO .....	42
3.3 CASUÍSTICA.....	42
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	43
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	43
3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	43
3.7 AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM.....	44
3.8 HIPÓTESE .....	44
3.9 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	44
3.9.1 Variável Dependente .....	44
3.9.2 Variáveis Independentes .....	44
3.10 DEFINIÇÕES E DIAGNÓSTICOS.....	45
3.11 PROCEDIMENTOS.....	48
3.11.1 Exames complementares .....	48
3.11.1.1 Teste cutâneo alérgico .....	48
3.11.1.2 Avaliação da celularidade e mediadores do lavado nasal .....	49
3.11.1.3 Avaliação histopatológica .....	52
3.11.1.4 Material empregado para realização dos procedimentos .....	54
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55

3.13 ÉTICA EM PESQUISA .....	56
3.14 CUSTOS, FOMENTOS E SERVIÇOS PARTICIPANTES .....	56
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS .....	58
4.2 LAVADO NASAL .....	62
4.3 HISTOPATOLOGIA.....	72
4.3.1 Lesão epitelial .....	79
4.3.2 Espessamento de membrana basal .....	81
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>131</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>138</b>
<b>PRODUÇÃO ACADÊMICA.....</b>	<b>145</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Asma e rinite apresentam semelhanças epidemiológicas, fisiopatológicas e clínicas, o que levou ao conceito de via aérea única (BOUSQUET *et al.*, 2001). A associação entre rinite e asma parece ser mais frequente em rinite persistente do que intermitente (LEYNAERT *et al.*, 1999).

Todas as doenças inflamatórias resultam em remodelamento, o qual pode evoluir para um processo de reconstrução normal ou patológico, sendo que na via aérea pode levar a alterações estruturais (BOUSQUET *et al.*, 1992; BOUSQUET *et al.*, 2000).

O processo inflamatório crônico na mucosa respiratória pode levar a alterações estruturais na via aérea, dando base ao conceito de remodelamento, o qual está bem caracterizado em asma brônquica (BOUSQUET *et al.*, 2000; VIGNOLA *et al.*, 2003). Desta forma, presume-se que também ocorra na rinite, caracterizando-se por aumento da espessura e do desprendimento epitelial, pseudofibrose da membrana basal, entre outras características, porém em menor extensão que na asma (WATANABE; KIUNA, 1998; SANAI; NAGATA; KONNO, 1999; CHANEZ *et al.*, 1999; BOUSQUET *et al.*, 2004; WATELET *et al.*, 2006; MORI *et al.*, 2012). Inflamação crônica e alteração estrutural das vias respiratórias superiores podem fazer parte do processo generalizado de remodelamento, que inclui também as vias respiratórias inferiores (BRAUNSTAHL, 2005).

Embora a mucosa nasal esteja mais exposta a agentes nocivos e a alérgenos, é menor a extensão do remodelamento da mucosa nasal. A reação inflamatória e o remodelamento na mucosa dos cornetos nasais resultam em edema e (ou) hipertrofia de cornetos, cuja consequência clínica é a obstrução nasal, um dos sintomas que mais interfere com a qualidade de vida dos pacientes com rinite (BOUSQUET *et al.*, 2004; MELTZER *et al.*, 2012). Aumento do número de eosinófilos na mucosa nasal é o parâmetro que apresenta melhor correlação com o sintoma obstrução nasal (CIPRANDI *et al.* 2005). Além disto, uma complexa vasculatura composta por denso sistema arterial e de sinusóides venosos cavernosos, cuja variação no engurgitamento também resulta em obstrução nasal grave (HOLMBERG; BAKE; PIPKORN, 1988; IGARASHI *et al.*, 1995; BALOGH, 1997).



Na rinite e na asma, a inflamação da mucosa é mantida por infiltrado inflamatório semelhante. Entretanto, a magnitude da reação inflamatória não é idêntica (CHANEZ *et al.*, 1999) e a inflamação eosinofílica da mucosa nasal está presente em asmáticos independente da presença de sintomas nasais (GAGA *et al.*, 2000).

O recrutamento e a migração de células inflamatórias para a cavidade nasal estão correlacionados à liberação de mediadores solúveis de ativação celular (BESANCON-WATELET *et al.*, 2002).

A extensão da lesão epitelial nas diferentes formas de rinite e a correlação com células e mediadores inflamatórios ainda não estão de todo esclarecidas. Presença de eosinófilos está associada à perda da integridade epitelial em pacientes com rinite alérgica ou não alérgica (AMIN *et al.*, 2001). Entretanto, há divergência quanto ao ponto de corte do número de eosinófilos considerado elevado nas amostras de secreção nasal, sendo que a forma de coleta da secreção nasal pode interferir na celularidade recuperada (HOWARTH *et al.*, 2005; CHAWES, 2011; NAIR; GOODWIN; HARGREAVE, 2011).

A mucosa nasal, pela facilidade de obtenção de amostra, permite o estudo das alterações celulares durante a reação alérgica (HOWARTH *et al.*, 2005). O lavado nasal é uma técnica relativamente não invasiva, de fácil execução para determinação do infiltrado celular e de mediadores (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995; BOUSQUET *et al.*, 2001). Permite a coleta de amostra para avaliação mais representativa pela técnica da citologia quantitativa do lavado nasal (BASCOM *et al.*, 1988; CRUZ *et al.*, 1993; KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001). No sobrenadante podem ser determinados mediadores solúveis de permeabilidade vascular e ativação celular, além dos produtos da secreção glandular (RAPHAEL *et al.*, 1988; TERADA *et al.*, 1994).

A desvantagem da técnica do lavado nasal é o fato das células recuperadas serem provenientes somente da luz da cavidade nasal e não necessariamente refletir a presença de processo inflamatório tissular epitelial (QUIRCE *et al.*, 2010); no qual o espessamento da membrana basal reticular é empregado como parâmetro de remodelamento da via aérea (BOUSQUET *et al.*, 2004).

A análise do infiltrado inflamatório da mucosa é útil como instrumento de pesquisa, para diagnóstico diferencial de rinite, seguimento do curso clínico e da

resposta terapêutica. Além disso, alterações morfológicas na mucosa nasal podem refletir reações em outros pontos da via aérea (BOUSQUET *et al.*, 2001).

Foi demonstrada presença de reação inflamatória brônquica após provocação nasal com alérgenos, bem como reação inflamatória nasal após provocação segmentar brônquica (BRAUNSTAHL *et al.*, 2001a; BRAUNSTAHL *et al.*, 2001b; SERRANO *et al.*, 2012).

A interação de células epiteliais e componentes subepiteliais, essencial no mecanismo de reparo normal da via aérea, constitui área recente de investigação (PASCUAL; PETERS, 2005), tendo sido proposto que uma alteração nesta interação tenha um papel central na fisiopatologia da asma (HOLGATE *et al.*, 2000). Estudos por biópsia evidenciam descamação epitelial, porém os achados são variáveis ao longo da via aérea e é frequente a descrição do achado de epitélio normal (PASCUAL; PETERS, 2005). Ativação de células epiteliais também é uma característica da rinite, sendo importante a avaliação de alterações estruturais nas vias aéreas superiores em pacientes com rinite alérgica (SALIB; HOWARTH, 2003).

Em ensaios de cultura, células epiteliais nasais podem substituir células epiteliais brônquicas, por apresentarem produção semelhante de citocinas. Por outro lado, morfológicamente apresentam menor taxa de proliferação e diferenciação de células ciliadas e caliciformes em relação às células epiteliais brônquicas (LOPEZ-GUISA *et al.*, 2012; THAVAGNANAM *et al.*, 2014).

Portanto, células epiteliais nasais podem substituir as brônquicas para facilitar a investigação de lesão epitelial em rinite e (ou) asma.

A celularidade, presente em amostras de lavado nasal de pacientes com rinite, é semelhante à encontrada em amostras de lavado brônquico de asmáticos, e desta forma o lavado nasal pode ser usado para o estudo de células e processo inflamatório da via aérea (PRAT *et al.*, 1993).

Se o processo de remodelamento da mucosa nasal se inicia tão precocemente quanto na mucosa brônquica, o estudo dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório, e consequente lesão epitelial, permite a avaliação de estratégias para prevenção ou redução dos efeitos, em longo prazo, do remodelamento na mucosa respiratória (TULIC; HAMID, 2010).

A análise simultânea do infiltrado celular e do grau de ativação celular em amostras de secreção nasal e de biópsia de mucosa nasal mostra diferenças entre os dois compartimentos (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995).

Portanto, o estudo do processo inflamatório em amostras simultaneamente obtidas pelo lavado nasal e da mucosa nasal, seja por raspado, biópsia ou material removido por turbinectomia, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na reação inflamatória nasal alérgica ou não alérgica. Também pode ser útil na monitorização da reação inflamatória nasal. A análise das alterações estruturais pode auxiliar na avaliação da extensão e da natureza do processo de remodelamento.

## 1.1 OBJETIVOS

Em pacientes atópicos e não atópicos com rinite:

- a) Comparar a gravidade de sintomas e sinais de rinite;
- b) Avaliar a relação entre o processo inflamatório na luz da cavidade nasal e extensão de lesão da mucosa nasal;
- c) Determinar o ponto de corte do percentual de eosinófilos nas amostras de lavado nasal, para diagnóstico de atopia.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A mucosa nasal pela facilidade de acesso permite a obtenção de material para análise das diferentes células e mediadores envolvidos no processo inflamatório da via aérea. O remodelamento da via aérea é um processo patológico estabelecido na asma, porém sua ocorrência não está de todo definida na rinite.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Rinite é definida como um processo inflamatório da mucosa do revestimento nasal, caracterizada pela presença de um ou mais dos seguintes sintomas: congestão nasal, rinorréia, espirros e prurido (II CONSENSO BRASILEIRO SOBRE RINITES, 2006).

A rinite pode ser classificada com base em critérios clínicos, frequência e intensidade de sintomas, citologia nasal e fatores etiológicos (II CONSENSO BRASILEIRO SOBRE RINITES, 2006).

Rinite alérgica resulta de uma reação inflamatória na mucosa nasal mediada por IgE a aeroalérgenos intra e extradomiciliares, como alérgenos de ácaros da poeira, pêlo de animais, baratas, fungos e pólenes. O diagnóstico está baseado no desencadeamento dos sintomas à exposição aos alérgenos e na confirmação da reatividade mediada por IgE por teste cutâneo alérgico ou determinação *in vitro* de IgE específica aos aeroalérgenos em questão. Na dependência da região onde mora o paciente e exposição aos alérgenos regionais, os sintomas podem ser intermitentes ou persistentes. Nos pacientes sensíveis a múltiplos alérgenos os sintomas podem ser persistentes, com exacerbações sazonais. Rinite alérgica é classificada como intermitente quando a duração dos sintomas é inferior a 4 dias por semana ou com duração inferior a 4 semanas consecutivas; por outro lado, se a duração dos sintomas for maior, a rinite é classificada como persistente. A rinite alérgica também pode ser classificada de acordo com a intensidade dos sintomas, desde leve a moderada e(ou) grave intensidade, conforme a interferência sobre a qualidade do sono, desempenho das atividades diárias, sejam escolares, esportivas ou laborais (BOUSQUET *et al.*, 2001; BOUSQUET *et al.*, 2002).

Inicialmente, a classificação da rinite alérgica levava em consideração o tempo de exposição, sendo subdividida em sazonal, perene e ocupacional (INTERNATIONAL CONSENSUS REPORT ON DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF RHINITIS, 1994; DYKEWICZ; FINEMAN, 1998). A classificação atual leva em consideração a duração e gravidade dos sintomas (BOUSQUET *et al.*, 2001; BOUSQUET *et al.*, 2002) (Figura 1). Entretanto os termos rinite sazonal e perene ainda são empregados para interpretação de estudos já publicados.

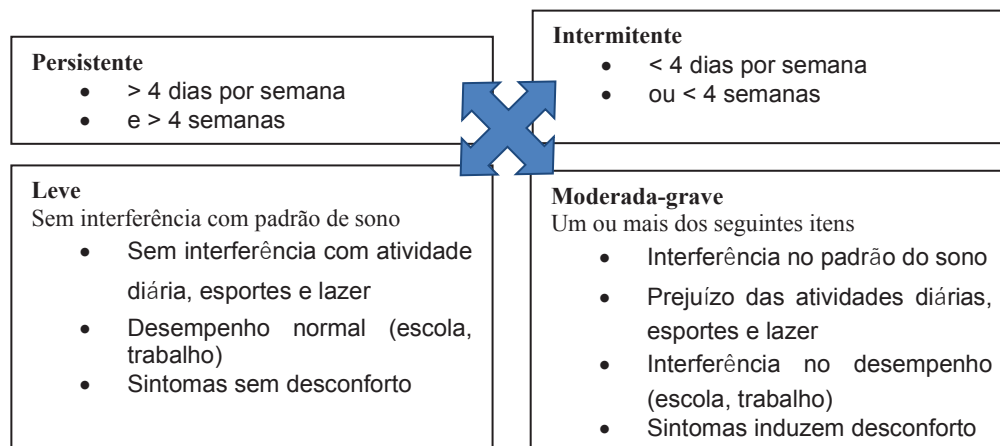


FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DA RINITE ALÉRGICA

FONTE: Adaptado de Bousquet J, *et al.* (2002)

A rinite é classificada como não alérgica quando os testes para investigação de atopia são negativos, apesar dos sintomas sugestivos de rinite. Rinite não alérgica engloba um grupo mais heterogêneo e inclui rinite induzida por drogas, rinite induzida por hormônios, rinite irritativa e rinite não alérgica persistente (PNAR) (BOUSQUET *et al.*, 2001; BOUSQUET *et al.*, 2002). Na PNAR o fator desencadeante é inespecífico e há controvérsias sobre sua subclassificação, sendo um critério a presença ou não de aumento do número de eosinófilos na secreção nasal. Na PNAR sem aumento do número de eosinófilos nasais, a rinite pode ser classificada como vasomotora (VMR), também denominada idiopática onde os sintomas são crônicos. O início dos sintomas é mais tardio, predominam sintomas de obstrução nasal, rinorréia e frequentemente há queixa de cefaléia, pressão nasal e rinorréia posterior; já sintomas como prurido, espirros e sintomas conjuntivais são menos prováveis. Comorbidades alérgicas não costumam estar presentes e os fatores desencadeantes mais comuns são variações de temperatura e umidade, bem como exposição a irritantes inespecíficos como odores e poluentes, especialmente a fumaça de cigarro (TOGIAS, 1990; CIPRANDI *et al.*, 2004).

Nos casos em que não se detecte a presença de atopia, porém com aumento do número de eosinófilos na secreção nasal, perante sintomas persistentes de espirros, prurido, rinorréia, obstrução nasal e ocasionalmente perda do olfato, a rinite é classificada como não alérgica eosinofílica (NARES) (JACOBS; FREEDMAN; BOSWELL, 1981).

A avaliação da gravidade da rinite pode ser feita pela repercussão dos sintomas nasais sobre atividades diárias e qualidade do sono, baseada na frequência, intensidade e duração de sintomas; também pela avaliação da coloração da mucosa nasal e grau de hipertrofia de cornetos, quantidade e aspecto do muco na cavidade nasal e alterações à oroscopia. A quantificação destes achados por escore clínico de sintomas e sinais, pode auxiliar na avaliação e comparação da gravidade da rinite em estudos clínicos (MELTZER, 1988; BOUSQUET *et al.*, 2001; MELTZER *et al.*, 2006).

A prevalência de doenças alérgicas investigada por estudo epidemiológico internacional ISAAC fase III (*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), evidenciou variabilidade regional e mundial na prevalência de rinite alérgica. Globalmente a prevalência de rinite alérgica foi de 8,5% para escolares (6 a 7 anos) e de 14,6% para adolescentes (13 a 14 anos) (MALLOL *et al.*, 2013). Na América Latina em média a taxa de prevalência de rinoconjuntivite alérgica foi de 12,7% para escolares e de 18,5% para adolescentes (SOLÉ *et al.*, 2010). No Brasil a prevalência de rinoconjuntivite alérgica foi de 12,6% para escolares e de 14,6% para adolescentes. Na região sul, a prevalência foi de 13,3% para escolares e 15,6% para adolescentes (SOLÉ *et al.*, 2006). Em Curitiba foi observado aumento na prevalência de rinoconjuntivite entre adolescentes, ao se comparar os resultados do ISAAC, realizados nos de anos de 1995 e 2001, respectivamente 14,2% e 17,2% (RIEDI *et al.*, 2005).

Estudos clínicos, epidemiológicos e fisiopatológicos evidenciam uma forte associação entre rinite e asma, o que levou ao conceito de via aérea única, influenciada por processo inflamatório comum, o qual pode ser mantido ou amplificado por mecanismos interligados (BOUSQUET *et al.*, 2001). Rinite alérgica está correlacionada e constitui fator de risco para a ocorrência de asma (WRIGHT *et al.*, 1994). A associação entre rinite e asma parece ser mais frequente em rinite persistente do que intermitente (LEYNAERT *et al.*, 1999).

Nos últimos 20 anos houve um aumento na prevalência de doenças alérgicas e estudos epidemiológicos evidenciam a coexistência de rinite e asma em pacientes pediátricos, adolescentes e adultos. Rinite está associada à hiperresponsividade brônquica inespecífica e tem sido apontada como fator de risco para o desenvolvimento de asma (BOUSQUET *et al.*, 2001). Estudos em adolescentes e adultos com rinite alérgica (RA) e rinite não alérgica (NAR) mostram prevalência de asma concomitante em 33 a 51% dos pacientes alérgicos e em 9 a 39% dos não

alérgicos (MOLGAARD *et al.*, 2007), indicando que asma está mais frequentemente associada à rinite alérgica do que à rinite não alérgica.

A proporção de rinite não alérgica entre adolescentes e adultos é de no mínimo 25% (MOLGAARD *et al.*, 2007).

A maioria dos pacientes com asma alérgica ou não alérgica apresenta sintomas de rinite, cuja prevalência descrita é de 80 a 90% (LEYNAERT *et al.*, 2000); enquanto a prevalência de sintomas de asma entre os pacientes com rinite varia de 10% a 40% (OZDOGANOGLU; SONGU, 2012).

Na América Latina, os resultados da fase III do Estudo Epidemiológico Internacional sobre Asma e Alergias na Infância (ISAAC) mostram prevalência de sintomas de asma associados à rinoconjuntivite em 21,6% dos casos na faixa etária dos 6 – 7 anos e em 26,9% na faixa etária dos 13 – 14 anos. Por outro lado, a prevalência de sintomas de rinoconjuntivite associados à asma foi de 29,5% entre a faixa etária de 6 -7 anos e de 24,6% entre 13 – 14 anos de idade (MALLOL *et al.*, 2013).

A prevalência de sintomas relacionados à asma e rinite no Brasil, entre escolares (6 – 7 anos) e adolescentes (13 – 14 anos), foi respectivamente de 24,3% e 19% para asma ativa e de 12,6% e 14,6% para rinoconjuntivite (SOLÉ *et al.*, 2006).

Existe uma relação temporal entre o início dos sintomas de rinite e da asma, sendo que a rinite geralmente precede o desenvolvimento da asma (LINNA; KOKKONEN; LUKIN, 1992). A observação clínica de que pacientes com asma de maior gravidade tendem a apresentar sintomas mais intensos de rinite alérgica do que pacientes com asma de menor gravidade (HUSE *et al.*, 1996), tem sido confirmada por estudos epidemiológicos. No entanto, apesar de relevante, a questão sobre rinite de maior gravidade estar associada a maior risco de asma, ainda necessita de estudos.

Após o estabelecimento da rinite e da asma; a história natural, as exacerbações e os fatores desencadeantes são semelhantes.

Na cavidade nasal estão situados os cornetos inferior, médio e superior, os quais aumentam a superfície da mucosa nasal em 150 a 200cm<sup>2</sup>, sendo responsáveis pela filtração, umidificação e regulação térmica do ar inspirado. A mucosa nasal é a primeira barreira física para condicionamento do ar inspirado, pela produção de muco, transporte mucociliar e regulação térmica (WATELET; VAN; CAUWENBERGE, 1999).



A mucosa da via aérea, da porção nasal à brônquica, apresenta revestimento semelhante com epitélio do tipo colunar ciliado pseudoestratificado (WATELET *et al.*, 2006).

A mucosa nasal é composta por três camadas, o epitélio pseudoestratificado com células ciliadas e não ciliadas, a membrana basal e a lâmina própria ou submucosa (córion). Os tipos celulares identificados no epitélio são: as células colunares ciliadas e não ciliadas que estão aderidas à membrana basal, bem como às células contíguas; as células caliciformes, que são glândulas unicelulares secretoras de muco (*goblet cells*) e as células basais, que são células de reserva que repõem as células descamadas, dividem-se e diferenciam-se em células produtoras de muco ou em células ciliadas e não ciliadas; todas estas células constituem a barreira epitelial (BALOGH, 1997).

As células caliciformes, na sua porção apical, contêm quantidade variável de muco, que é escoado na superfície para formar uma camada sobre o epitélio respiratório. O muco também provém das glândulas seromucosas da lâmina própria. Em condições normais, a maioria das células do epitélio respiratório é composta por células ciliadas, cuja função, pela constante e coordenada movimentação, é mover o muco e remover partículas em direção à faringe (BALOGH, 1997).

A membrana basal do epitélio da via aérea engloba duas camadas, as lâminas basal e reticular. A espessura da membrana basal por microscopia ótica, em amostras de mucosa de cornetos nasais inferiores, varia de 10 a 15µm. A membrana basal é composta por várias substâncias como moléculas de adesão celular e proteínas da matriz extracelular (ECM). Pela técnica de imunohistoquímica da membrana basal foram evidenciados os componentes da lâmina basal (colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanos) e da lâmina reticular (colágeno tipo I, III, V, VI e fibronectina). Colágeno do tipo VII se distribuiu entre filamentos logo abaixo da lâmina basal (AGHAMIR-SALIM; RAUHUT; MERKER, 1993; SANAI; NAGATA; KONNO, 1999; MORI *et al.*, 2012).

A espessura da membrana basal em amostras de mucosa brônquica foi maior em asmáticos ( $9,1 \pm 2,2\mu\text{m}$ ) em relação ao grupo controle ( $7,7 \pm 1,2\mu\text{m}$ ) (WARD *et al.*, 2002); porém o achado de espessamento da membrana basal não é uniforme, bem como não está relacionado à gravidade de asma (CHU *et al.*, 1998).

A comparação da medida da membrana basal de amostras do epitélio brônquico, em diferentes níveis da via aérea, de controles saudáveis em relação a



asmáticos, evidenciou a presença de espessamento significativo da membrana basal em asmáticos. A média da medida da espessura da membrana basal, respectivamente em níveis lobar e subsegmentar, foi de 3,7 (0,3) $\mu\text{m}$  e 4,3 (0,4) $\mu\text{m}$  (grupo controle) e de 8,3 (0,5) $\mu\text{m}$  e 8,3 (0,6) $\mu\text{m}$  (asmáticos) (JEFFERY, 2001).

Crianças e adultos asmáticos apresentaram medidas semelhantes de espessamento da membrana basal [8,2 $\mu\text{m}$  (5,4 - 11,1)], tendo sido maior que no grupo controle pediátrico 4,9 $\mu\text{m}$  (3,7 - 8,3) ou no de adultos 4,4 $\mu\text{m}$  (3,2 - 6,3). Os autores concluíram que além de semelhante espessamento da membrana basal, não houve associação deste achado à duração dos sintomas, função pulmonar ou concomitante inflamação eosinofílica da via aérea (PAYNE *et al.*, 2003).

A submucosa nasal contém células inflamatórias (linfócitos, monócitos e plasmócitos) e estruturais (fibroblastos). Podem também estar presentes mastócitos e eosinófilos; glândulas serosas e seromucosas, terminações nervosas e complexa vasculatura composta por densa rede de capilares, sistema arterial e sinusóides venosos cavernosos, cuja variação na vascularização acarreta obstrução nasal grave (HOLMBERG; BAKE; PIPKORN, 1988; IGARASHI *et al.*, 1995; BALOGH, 1997). Estes vasos sanguíneos podem rapidamente dilatar e contrair, permitindo ajuste rápido da temperatura da mucosa em resposta às variações climáticas (BALOGH, 1997).

A secreção nasal provém das glândulas submucosas, células caliciformes, lágrimas e exsudação dos vasos sanguíneos, sendo composta de albumina, imunoglobulinas, enzimas proteolíticas e bacteriolíticas, mediadores e células, compondo uma proteção inespecífica contra infecções. A velocidade de transporte de partículas pelo batimento ciliar, está em torno de 3 a 25mm/minuto, sendo reduzida pelo processo de inflamação alérgica (BALOGH, 1997; WATELET; VAN CAUWENBERGE, 1999).

A resposta inflamatória alérgica é controlada por células do sistema imunológico que regulam a atividade de outras células imunológicas e estruturais. Envolve uma complexa interação de alérgenos e células efetoras. Alérgeno inalado liga-se à IgE presente na superfície de mastócitos, com liberação de mediadores pró-inflamatórios como histamina e leucotrienos cisteínicos, que induzem aumento da permeabilidade vascular e estimulação da secreção glandular (RAPHAEL *et al.*, 1991; BOUSQUET *et al.*, 2001); citocinas Th2, como IL-4 e IL-5 (responsáveis pela quimiotaxia e aumento da sobrevivência de eosinófilos) (DURHAM *et al.*, 1992;

BOCHNER; SCHLEIMER, 1994; SIM *et al.*, 1994); quimiocinas, como IL-8 (responsável pela quimiotaxia de neutrófilos) (KLEINJAN *et al.*, 1999; KAY, 2001), bem como aumento da expressão de moléculas de adesão (CIPRANDI *et al.*, 1994).

O recrutamento e migração de células inflamatórias envolve passagem pela parede capilar e interstício, o que requer a degradação de proteínas da matriz extracelular (ECM) por secreção de metaloproteinases da matriz (MMP), as quais compreendem endopeptidases que podem decompor a ECM e a membrana basal. Desta forma participam no processo de remodelamento tissular e infiltração celular, especialmente as MMP-2 e MMP-9, que degradam elastina e colágeno tipos IV (principal componente da membrana basal) e V, facilitando a migração celular (SHAIDA *et al.*, 2001; SALIB; HOWARTH, 2003; MORI *et al.*, 2012).

Na mucosa brônquica o espessamento da membrana basal não impede a passagem de células inflamatórias pelo epitélio brônquico, as quais podem facilmente migrar pela liberação de enzimas, como as metaloproteinases (JEFFERY, 2001).

Inibidores tissulares das metaloproteinases (TIMP) impedem a ativação das MMP; no entanto, um desequilíbrio em condições inflamatórias, contribui para a lesão tissular (MORI *et al.*, 2012). A consequência é a infiltração e aumento da sobrevivência de células na mucosa e na secreção nasal, que inclui eosinófilos, mastócitos, linfócitos T e macrófagos (DURHAM *et al.*, 1992; BOUSQUET *et al.*, 2000; BOUSQUET *et al.*, 2001).

As diferenças entre rinite e asma incluem um alto grau de vascularização ao nível da mucosa nasal, por uma ampla rede de capilares subepiteliais, um sistema arterial e de sinusóides venosos cavernosos, sendo que alterações na vasculatura podem levar à obstrução nasal grave (HOLMBERG; BAKE; PIPKORN, 1988). Por outro lado, a resposta contrátil da musculatura lisa, potencializada pela interação de mediadores liberados por células estruturais, inflamatórias ou epiteliais, determina a característica broncoconstrição na asma (BOUSQUET *et al.*, 2001; PANETTIERI, 2002; BOUSQUET *et al.*, 2004).

A sobrevivência dos eosinófilos está aumentada na asma devido a um decréscimo na apoptose, a qual está ligada ao fator estimulador de colônia granulócito-monócito (GM-CSF) (SIMON; BLASER, 1995). No sobrenadante de células epiteliais nasais também há um aumento da sobrevivência de células inflamatórias (XING *et al.*, 1992).

Na rinite e na asma, a inflamação da mucosa é mantida por infiltrado inflamatório semelhante. Entretanto, a magnitude da reação inflamatória não é

idêntica (CHANEZ *et al.*, 1999) e a inflamação eosinofílica da mucosa nasal está presente em asmáticos, independente da presença de sintomas nasais (GAGA *et al.*, 2000).

Em suma, a reação inflamatória nasal resulta de intenso recrutamento e prolongada sobrevivência de células inflamatórias, devido às interações com moléculas de adesão e provável alteração na apoptose (BOUSQUET *et al.*, 2001).

No Quadro 1 estão sumarizados os resultados de vários estudos, com intuito de avaliar a reação inflamatória e o número de eosinófilos por diferentes técnicas de coleta e avaliação da celularidade nasal, as quais incluem: manobra de assoar o nariz, raspagem, lavado nasal e biópsia. Entretanto, há divergência quanto ao ponto de corte do número de eosinófilos considerado elevado nas amostras de secreção nasal (HOWARTH *et al.*, 2005; CHAWES, 2011; NAIR; GOODWIN; HARGREAVE, 2011).

QUADRO 1 – RESULTADOS DOS ESTUDOS DO LAVADO E CITOLOGIA NASAL OBTIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS

AUTOR/ANO	TÉCNICA	AMOSTRA	PONTO DE CORTE	CELULARIDADE	MEDIADORES
Bascom <i>et al.</i> , 1988	Lavado nasal, Provação nasal com alérgeno	n = 5 Controle n=10 RAS	Eosínófilos Basal 0,08±0,7x10 <sup>5</sup> Neutrófilos: Basal 0,6±0,4x10 <sup>5</sup>	Eosínófilos: 1h pós NAC: 0,5±0,3x10 <sup>5</sup> 1 <sup>ah</sup> Máximo: 9-11h pós NAC: 3,3±0,6x10 <sup>5</sup> /h (↑ 52x) Neutrófilos: 10h pós NAC: 11,5±10,5x10 <sup>5</sup> Eosínófilos: RAP: 20% (0-75%)	N.D.
Cruz <i>et al.</i> , 1993	Lavado nasal (CQLN)	12 a 50 <sup>a</sup> n=20 Controle n=20 RAP	Eosínófilos: 5% / Sensibilidade: 80% / Especificidade: 82% Acurácia: 82% Eosínófilos: ≥10% Razão: eos/neut: >0,1	Eosínófilos: RAP: 20% (0-75%)	N.D.
Lee <i>et al.</i> , 1993	Lavado nasal, Citologia quantitativa, Cytospin	Idade: ≥16 <sup>a</sup> n=17 Controle n=28 RAS n=24 RAP	N.D.	Eosínófilos (%) Controle: 0,64±0,39 RAS: 74,56±4,2 RAP: 70,85±5,8 Eosínófilos Controle: 0,03±1x10 <sup>4</sup> RAP: 0,49±1x10 <sup>4</sup>	Neutrófilos (%) Controle: 91,4±11,9 RAS: 15,7±3,9 RAP: 18,9±4,9 RAP – correlação Alb/Proteína total Eosínófilos (r=0,83; p<0,01) N.D.
Prat <i>et al.</i> , 1993	Lavado nasal	Adultos n=11 Controle n=14 RAP	N.D.	Eosínófilos RAS: Basal: 0,32±0,2x10 <sup>5</sup> 24h após NAC: 1,2±0,8x10 <sup>5</sup>	N.D.
Lim; Taylor; Nadlerio, 1995	Lavado nasal, Provação nasal com alérgeno	Adultos n=11 Controle n=18 RAS n=18 RAP	N.D.	Eosínófilos RAS: Basal: 0,32±0,2x10 <sup>5</sup> 24h após NAC: 1,2±0,8x10 <sup>5</sup>	N.D.
Wang <i>et al.</i> , 1996	Provação nasal com alérgeno, Secreção nasal	n=10 Controle n=18 RAS fora da estação	Eosínófilos: Basal 2%	Eosínófilos 2-8h pós NAC: 8 a 13,3%	ECP: / Basal: 105 ng/g 24h pós NAC: 410ng/g / (32-2298 ng/g)
de Graaf <i>et al.</i> , 1996	Raspado da mucosa nasal, Lavado nasal	n=11 Controle n=48 RA	N.D.	RA vs controle: Eosínófilos: 1,9 vs 0%	RA vs controle / Albumina: 8,61 vs 2,37 mg/mL / LTC4/D4/E4: 17,51 vs 1,43 pg/mL ECP: Fora estação polínica: / 1,3 ng/mL (1,14-1,52) / Durante estação polínica: 16,33 ng/mL / (10,33-25,08)
Di Lorenzo <i>et al.</i> , 1997	Raspado nasal, Lavado nasal	n=10 Controle n=20 RAS	Eosínófilos: Fora estação polínica: 2% (1 – 2%) Controle: 1,5 % (1 – 2%)	Eosínófilos: Durante estação polínica: 17% (11,5 – 26)% / Controle: 2,0 % (1,0-2,0)	N.D. Jankowski <i>et al.</i> , 2000
Jirapongsananuruk; Vichyanond, 1998	Raspagem (Rhinoprobes, Coloração: Wright-Giemsa)	Idade ≤15 <sup>a</sup> n=41 Controle	Diagnóstico de RA eos: > 0,5 n=48 RA	Sensibilidade 91,7% / Especificidade 100% VPP: 100% VPN: 91,1%	

continua

QUADRO 2 – RESULTADOS DOS ESTUDOS DO LAVADO E CITOLOGIA NASAL OBTIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS

AUTOR/ANO	TÉCNICA	AMOSTRA	PONTO DE CORTE	CELULARIDADE	MEDIADORES	conclusão
Jankowski et al., 2000	Secreção nasal	Adultos/n= 129PNAR/n=40 Controle	Hipereosinofilia: 20%	Eosinófilos: 15,1±2,3% Controle: 5±2,6%	PNAR:	N.D.
Amin et al., 2001	Esfregaço e secreção nasal	Adultos n=17 RAP fora estação n=10 RAP durante estação n=12 PNAR	Média da contagem de eosinófilos na secreção nasal: 0-3	Eosinófilos RAP fora estação: 0,62 RAP durante estação: 0,65 PNAR: 1,33		N.D.
Kovalhuk et al., 2001	Crianças Lavado nasal (CQLN)	n=13 Controle n=15 RAP n=33 RAP+Asma		N.D. Correlação: Eosinófilos e ECP / (r=0,55; P<0,0001)		
Ciprandi et al., 2005	Raspado nasal	Adultos n=50 RAS durante estação polínica		N.D. Eosinófilos: 10,5 ± 4 % Neutrófilos: 21,3 ± 6%	Correlação: Eosinófilos e IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$	
Ventura et al., 2007	Secreção nasal induzida por nebulização de salina hipertônica (4,5%)	Adultos n=16 Controle n=29 RA n=23 NARES		N.D. Eosinófilos (Média) % (DP) Controle: 0,6 ± 0,6 RA: 20,8 ± 23,1 NARES: 18,7 ± 22,8		N.D.
Chawes, 2011	Raspado nasal	Crianças (6a) n= 138 Controle n= 23 RA n= 60 RNA	Eosinófilos: $\geq$ (1+): 1,1 – 5 células/por 10 campos de maior aumento	Eosinofilia nasal em 18 crianças: Eosinófilos $\geq$ (1+) :1,1–5 células/por 10campos Controle: 5/138 (4%) RA: 6/23 (26%)		N.D.
Gelardi et al., 2011	Raspado nasal	Adultos n=62 RA Intermitente 68%/ (Mod/grave: 34%) Persistente 32%/ (Mod/grave: 18%) n= 18 Controle		N.D. RNA: 7/60 (12%) Celularidade (Média % $\pm$ DP) Rinite: Intermitente/ou Persistente (n=30) / Mod/grave (n=32) Neutrófilo: 88,1 $\pm$ 5,3 / 76,8 $\pm$ 10 (p=0,04) Eosinófilo: 11,3 $\pm$ 6,2 / 13,8 $\pm$ 11 (p=0,01) Eosinófilos (Média) % (SE) Secreção nasal / Dia 1: 8,1 (4,1) Dia 2: 11 (5,7) Lavado nasal: 2,1(1,5)	Rinite: Leve, Moderada/Grave Intermitente (n=42) / Persistente (n=20) Neutrófilo: 82,1 $\pm$ 7,8 / 78,1 $\pm$ 15 (NS) Eosinófilo: 13,6 $\pm$ 9,7 / 17,1 $\pm$ 9,8 (NS)	
Nair; Goodwin; Hargreave, 2011	Secreção nasal, Lavado nasal	Adultos n=19 RA		N.D. Secreção nasal / Dia 1: 8,1 (4,1) Dia 2: 11 (5,7) Lavado nasal: 2,1(1,5)		N.D.

FONTE: O autor (2014) NOTA: CQLN: Citologia quantitativa do lavado nasal NAC: Provocação nasal com alérgeno PNAR: Rinite não alérgica perene NARES: Rinite não alérgica eosinofílica N.D.: Não determinado RAS: Rinite alérgica sazonal RAP: Rinite alérgica perene ECP: Proteína catiônica eosinofílica LT: Leucotrienos

Lavado nasal é uma técnica relativamente não invasiva, fácil de ser executada em adultos e crianças. Consiste na instilação de fluidos na cavidade nasal, seguida de coleta após tempo predeterminado; fornece amostra de células viáveis para investigação do processo inflamatório da mucosa nasal e da luz da cavidade nasal (BASCOM *et al.*, 1988; CRUZ *et al.*, 1993; LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995; KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001), tanto em situação basal quanto após provocação nasal (NACLERIO *et al.*, 1983; BENSON *et al.*, 1997; GOSSET *et al.*, 1997; TERADA *et al.*, 2001).

A análise do infiltrado inflamatório da mucosa nasal pela técnica da citologia quantitativa do lavado nasal previamente empregada em adultos (CRUZ *et al.*, 1993) e em crianças atópicas (KOVALHUK *et al.*, 1999) está estabelecida como instrumento de pesquisa.

A partir da centrifugação do fluido recuperado pelo lavado nasal, obtém-se um botão de células, cuja análise microscópica permite quantificação do infiltrado inflamatório e avaliação morfológica das células do revestimento nasal (HOWARTH *et al.*, 2005). No sobrenadante podem ser determinados mediadores solúveis de permeabilidade vascular e ativação celular, além dos produtos da secreção glandular (RAPHAEL *et al.*, 1988; TERADA *et al.*, 1994).

A instilação nasal de solução salina isotônica para obtenção das amostras de lavado nasal não interfere com a secreção de mucina, também não afeta a morfologia das células epiteliais (KIM *et al.*, 2005).

A albumina é uma proteína sérica que corresponde entre 10 a 20% do conteúdo proteico das secreções nasais, a quantidade de albumina é um indicador de permeabilidade vascular. Também é um parâmetro para se estimar uma diluição do fluido nasal. Entre indivíduos não atópicos e atópicos com rinite alérgica sazonal, fora da estação polínica, os níveis basais de albumina foram semelhantes e a instilação de solução salina não resultou em aumento significativo do conteúdo proteico das secreções nasais. Portanto, a instilação de solução salina não interfere na avaliação dos mediadores presentes em amostras do lavado nasal (RAPHAEL *et al.*, 1988).

Com intuito de determinar quais são as fontes proteicas da secreção nasal, foram mensuradas as concentrações de albumina, lactoferrina e lisozima em amostras de lavado nasal após provocação nasal com alérgenos. Houve aumento na razão albumina/proteína total no lado homólogo à provocação, resultante do aumento da permeabilidade vascular; enquanto que nas amostras obtidas da narina contralateral,

houve aumento na proporção relativa da lactoferrina e lisozima, resultantes da secreção glandular reflexa (RAPHAEL *et al.*, 1991).

Os mecanismos de rinite alérgica têm sido esclarecidos pelos testes de provocação nasal com alérgenos ou mediadores pró-inflamatórios e pela medida, nas amostras de fluido nasal, de células e mediadores liberados durante as fases imediata e tardia da reação alérgica (NACLERIO *et al.*, 1983).

Em amostras de lavado nasal de crianças com rinite alérgica sazonal, durante estação polínica, foi demonstrado aumento dos níveis de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) e decréscimo dos níveis de IFN- $\gamma$  (BENSON *et al.*, 1997). Após 24 e 48 horas da provocação nasal com alérgenos, foi descrita elevação na secreção nasal, da contagem de neutrófilos, monócitos, linfócitos e de células caliciformes, além de aumento da concentração de IFN- $\gamma$ , mas não de IL-4 (PELIKAN, 2013).

Recentemente, mediadores como eotaxina-3 e IL-17 foram detectados em amostras de lavado nasal de pacientes com rinite alérgica, cujos níveis se elevaram discretamente durante estação polínica; porém, a elevação foi mais significativa após provocação nasal com alérgeno. Por outro lado e de forma oposta ao esperado, o nível de IL-4 foi significativamente menor nos alérgicos em relação aos não alérgicos (BAUMANN *et al.*, 2013). Também foi descrita correlação entre IL-5 e eosinófilos e entre IL-8 e neutrófilos (BENSON *et al.*, 1999).

Interleucina-8 exerce efeito quimiotático para neutrófilos e para eosinófilos (*primed eosinophils*). Em pacientes sensibilizados, há liberação de IL-8 nas fases imediata e tardia de provocação com alérgeno, seguida de aumento do número de neutrófilos no lavado nasal (ROSELER *et al.*, 1995; GOSSET *et al.*, 1997).

O recrutamento e a migração de células inflamatórias para a cavidade nasal estão correlacionados à liberação de mediadores solúveis de ativação celular (BESANCON-WATELET *et al.*, 2002).

Na fase tardia da reação alérgica, há predomínio da infiltração e ativação de eosinófilos, sendo caracterizada principalmente pelo sintoma obstrução nasal. Em pacientes com rinite alérgica, aumento do número de eosinófilos e nível elevado de mediadores no fluido nasal, estão associados à hiperreatividade e efeito “*priming*” da mucosa nasal (WANG; CLEMENT, 2000).

Usualmente gravidade está correlacionada à intensidade da inflamação, tendo sido descrita associação entre infiltração eosinofílica e redução do fluxo aéreo nasal (CIPRANDI; MARSEGLIA; KLERSEY, 2005).



Em amostras de raspado nasal, pacientes com rinite de moderada a grave intensidade apresentaram maior proporção de eosinófilos, mastócitos e de linfócitos em comparação aos com rinite de leve intensidade, sejam com sintomas intermitentes ou persistentes (GELARDI *et al.*, 2011). Por outro lado, em amostras de biópsia de corneto inferior de pacientes com rinite alérgica persistente de moderada/grave intensidade a infiltração eosinofílica e de mastócitos foi significativamente maior em comparação a pacientes com sintomas intermitentes (LIU *et al.*, 2010).

Na rinite alérgica intermitente ou persistente as mesmas células e mediadores são importantes; o que se desenvolve é a hiperreatividade nasal.

O conceito de inflamação mínima persistente (CIPRANDI *et al.*, 1995) presente na alergia perene e sazonal, explica a presença de inflamação, independente da presença de sintomas. Todas as doenças inflamatórias resultam em remodelamento, o qual pode evoluir para um processo de reconstrução normal ou patológico, sendo que na via aérea pode levar a alterações estruturais (BOUSQUET *et al.*, 1992; BOUSQUET *et al.*, 2000).

Remodelamento tissular em vias respiratórias superiores inclui aumento da espessura epitelial, acúmulo de proteínas plasmáticas, deposição e degradação da matriz, sendo que fibrose subepitelial pode ocorrer precocemente. Outras alterações estruturais estão relacionadas à duração da doença e reação inflamatória não controlada, que podem interferir com depuração mucociliar e condicionamento do ar inspirado (WATELET *et al.*, 2006; CIPRANDI *et al.*, 2008).

O remodelamento da via aérea se caracteriza por aumento do desprendimento epitelial, áreas de metaplasia epitelial, pseudofibrose da membrana basal entre outras características, as quais são mais pronunciadas na asma que na rinite (BOUSQUET *et al.*, 2004, MORI *et al.*, 2012). Estas alterações patológicas são causadas pelas MMP secretadas pelas células epiteliais, fibroblastos e células inflamatórias; além do aumento da permeabilidade da microvasculatura, edema, migração células e remodelamento nos sítios de inflamação (MORI *et al.*, 2012).

Apesar do processo inflamatório semelhante, é menor a extensão do remodelamento da mucosa nasal, bem como sua consequência clínica, diferente do que ocorre na mucosa brônquica (BOUSQUET *et al.*, 2004). Atribui-se a menor extensão do remodelamento na mucosa nasal que na mucosa brônquica devido a produção de citocinas pelas células da musculatura lisa brônquica e a diferenças na



origem embriológica, que tornam a estrutura nasal menos susceptível ao remodelamento (BOUSQUET *et al.*, 2004; JEFFERY; HAAHTELA, 2006).

Na asma o processo inflamatório e de remodelamento resulta de uma complexa interação de células inflamatórias (eosinófilos, células T ativadas, mastócitos e macrófagos) e células estruturais (epiteliais, fibroblastos e musculatura lisa), pela liberação de mediadores, citocinas e quimiocinas. Alterações estruturais em asma incluem ruptura epitelial, hiperplasia de células caliciformes, aumento do número de glândulas submucosas, aumento do número de vasos sanguíneos, intensa deposição de colágeno e de proteínas da matriz, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa, aumento da deposição de colágeno tipo IV e espessamento da membrana basal reticular (VIGNOLA *et al.*, 2003; BUSH, 2008), sendo o processo de remodelamento intensificado pela reação inflamatória (BOUSQUET *et al.*, 2000; WATELET *et al.*, 2006).

O resultado é reação inflamatória com aumento da permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, descamação epitelial e estreitamento da via aérea. Paralelamente, células epiteliais e mesenquimatosas, pela liberação de mediadores solúveis, favorecem a persistência do infiltrado inflamatório e induzem alterações estruturais na parede da via aérea, como aumento da espessura da membrana basal, aumento na deposição de colágeno, alteração na microcirculação brônquica, além da hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa brônquica. A consequência é o aumento da espessura da parede da via aérea e estreitamento da via aérea (CHIAPPARA *et al.*, 2001), cuja repercussão fisiológica é a perda progressiva da função pulmonar (PASCUAL; PETERS, 2005).

O processo de remodelamento na asma brônquica inclui o aumento da expressão e liberação de fatores de crescimento, secretados pelas células estruturais e pelas células inflamatórias infiltradas, como “*transforming growth factor-β*” (TGF-β), fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos, deposição de colágeno e fibronectina abaixo da membrana basal, aumento dos níveis de elastase, metaloproteínas e inibidores tissulares de metaloproteínas (TIMP) no fluido da via aérea (REDINGTON *et al.*, 2001; BOUSQUET *et al.*, 2004; PASCUAL; PETERS, 2005).

Em ensaios de cultura a partir de células epiteliais nasais e brônquicas de asmáticos, foi demonstrado aumento significativo de fatores pró-remodelamento, como TGF-β2 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), em relação ao grupo

controle e a atópicos não asmáticos (LOPEZ-GUISA *et al.*, 2012). Fisiologicamente, células epiteliais nasais respondem de forma semelhante a estímulo exógeno, com produção de citocinas; no entanto, morfológicamente exibem menor taxa de proliferação e diferenciação de células ciliadas e caliciformes (THAVAGNANAM *et al.*, 2014). Desta forma, células epiteliais nasais podem substituir as brônquicas para facilitar a investigação de lesão epitelial em rinite e/ou asma.

Na rinite alérgica, células epiteliais ativadas apresentam aumento da expressão de TGF- $\beta$  e seus receptores, o que está relacionado a alterações no mesênquima, como infiltração de células inflamatórias e aumento da produção de colágeno tipos I e III. Também o achado, nas vias respiratórias inferiores, de significativa deposição de fibronectina e de colágeno tipos I e III, logo abaixo da membrana basal, em pacientes não asmáticos com rinite, dão embasamento a ocorrência de remodelamento semelhante na via aérea, ainda que em menor proporção do que o que ocorre em asma brônquica (SANAI; NAGATA; KONNO, 1999; SALIB; HOWARTH, 2003).

Há contradição nos resultados da investigação da presença de lesão epitelial à mucosa nasal de pacientes com rinite alérgica (BOUSQUET *et al.*, 2004), desde ausência de lesão à descrição de descamação epitelial e edema intercelular; entretanto, a ausência de diferenças na mucosa nasal de pacientes com e sem rinite não pode ser considerada como evidência de ausência de remodelamento em rinite (SALIB; HOWARTH, 2003).

Fatores como técnica para coleta e processamento da amostra, seleção de pacientes e métodos de análise e (ou) coloração da amostra, podem explicar a variabilidade dos resultados descritos nos diferentes estudos (SALIB; HOWARTH, 2003; HOWARTH *et al.*, 2005), bem como a diferenças na intensidade do processo inflamatório em níveis distintos de uma mesma amostra.

Lesão epitelial e às junções firmes das células epiteliais foram demonstradas por análise à microscopia ótica e eletrônica da mucosa nasal de pacientes com rinite alérgica (ISHII *et al.*, 2000). Em pacientes com rinite alérgica sazonal, fora da estação polínica, foi encontrado aumento da espessura do epitélio em comparação à espessura de controles normais (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995). Durante a estação polínica, pacientes alérgicos apresentam hiperplasia de células caliciformes, enquanto que metaplasia e displasia de células ciliadas são encontradas durante todo o ano (GLUCK; GEBBERS, 2000). Em outro estudo, independente do período

estacional, não houve diferença no número de células caliciformes (KARLSSON; PIPKORN, 1989).

Em pacientes com rinite alérgica perene também há descrição de espessura epitelial comparável à de controles normais (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995; AMIN *et al.*, 2001). Em pacientes sensibilizados aos ácaros da poeira, lesão epitelial foi evidenciada na mucosa nasal anterior, onde prevalecem células não ciliadas, mas foi mínimo na mucosa nasal posterior (WATANABE; KIUNA, 1998). Metaplasia de células epiteliais está presente em amostras de biópsia nasal de pacientes com rinite perene (MINSHALL *et al.*, 1998; LALIBERTE *et al.*, 2000) e pode ser reduzida com o uso prolongado de corticóide nasal (MINSHALL *et al.*, 1998). Em asmáticos, as alterações epiteliais são muito menos extensas na mucosa nasal que na brônquica (CHANEZ *et al.*, 1999).

Ruptura epitelial e descamação são mais pronunciadas na mucosa brônquica de asmáticos que na mucosa nasal de pacientes com rinite, embora a mucosa nasal esteja mais exposta a agentes nocivos e a alérgenos (BOUSQUET *et al.*, 2004). Quando se compara um marcador de coesão epitelial, a imunoreatividade está alterada em amostras de biópsia brônquica, mas não nas amostras de mucosa nasal dos mesmos pacientes (CHANEZ *et al.*, 1999). Além disso, desprendimento epitelial é mais extenso em pacientes com asma de moderada intensidade que com asma leve intermitente (VIGNOLA *et al.*, 1998).

Angiogênese é importante componente de remodelamento da via aérea em asma. Na mucosa nasal de pacientes com rinite alérgica foi descrito aumento da vascularização e da expressão de fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), um potente fator angiogênico (MORI *et al.*, 2000).

Estudo experimental em rinite investigou o aumento da vascularização e da permeabilidade vascular causado por fatores angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e PD-ECGF, em relação à infiltração de células inflamatórias, particularmente eosinófilos. Foi observada intensa inflamação eosinofílica, fibrose subepitelial, aumento da proporção de células caliciformes em resposta a inflamação alérgica crônica, caracterizando remodelamento na mucosa nasal (MOON *et al.*, 2012).

Espessamento da membrana basal reticular é um parâmetro empregado de remodelamento da via aérea. Na rinite alérgica há algum grau de espessamento da

membrana basal, causado por deposição de colágeno e fibrose proteica, porém em menor proporção do que ocorre na asma (BOUSQUET *et al.*, 2004).

Alteração na distribuição ou deposição excessiva de colágeno são potenciais marcadores de remodelamento. Embora a presença destes achados na via aérea de maior calibre de asmáticos não tenha se associado à gravidade de asma (CHU *et al.*, 1998; VIGNOLA *et al.*, 1998).

Em pacientes sem tratamento e com asma de moderada intensidade, foi evidenciado aumento da espessura da camada basal reticular, mais pronunciado nas amostras de mucosa brônquica que nasal (CHANEZ *et al.*, 1999).

Na avaliação da mucosa nasal são poucos os estudos com análise da membrana basal reticular e os resultados são variáveis, seja avaliação feita por microscopia eletrônica (BAVBEK *et al.*, 1996) ou imunohistoquímica (EREL *et al.*, 2000). Espessamento da membrana basal foi maior em pacientes alérgicos que em não alérgicos, com extensa imunoreatividade para colágeno tipo I e III, que correspondem à região subepitelial (SANAI; NAGATA; KONNO, 1999). Alteração no padrão de distribuição do colágeno, proteoglicanos e vasos linfáticos, resulta no remodelamento da mucosa nasal em rinite alérgica persistente de leve a grave intensidade (KIM *et al.*, 2010).

Pacientes com asma grave apresentam maior espessamento da membrana basal em comparação à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Portanto, deduz-se ser este um processo específico da asma, mais que uma simples associação com mecanismo de remodelamento não específico da via aérea (BOURDIN *et al.*, 2007).

Foi descrita presença de espessamento semelhante da membrana basal reticular em crianças asmáticas e em adultos com asma de leve a moderada intensidade; sem correlação entre o grau de espessamento da membrana basal com duração dos sintomas ou gravidade de asma (PAYNE *et al.*, 2003), indicando ser precoce sua ocorrência na evolução da asma, além de ausência de relação com duração da inflamação crônica e (ou) gravidade da doença (JEFFERY, 2001).

Estudos para investigação da ocorrência de remodelamento brônquico, em pacientes não asmáticos com rinite alérgica, mostraram que a espessura da membrana basal está aumentada (DJUKANOVIC *et al.*, 1992; CHAKIR, *et al.*, 1996), o que leva ao questionamento da especificidade deste achado como marcador de asma (BRAUNSTAHL *et al.*, 2003). Entretanto, são poucos estudos com esta

abordagem; por outro lado, inflamação crônica e alteração estrutural das vias respiratórias superiores, podem fazer parte de processo generalizado de remodelamento, que inclui também vias respiratórias inferiores (CHANEZ *et al.*, 1999; GAGA *et al.*, 2000; BRAUNSTAHL, 2005; SERRANO *et al.*, 2012).

A análise do infiltrado inflamatório da mucosa é útil como instrumento de pesquisa para diagnóstico diferencial de rinite, seguimento do curso clínico e da resposta terapêutica. Além disso, alterações morfológicas na mucosa nasal podem refletir reações em outros pontos da via aérea (BOUSQUET *et al.*, 2001).

Estes achados dão subsídios para o emprego de um método simples e não invasivo de investigação dos mecanismos inflamatórios envolvidos nas doenças respiratórias alérgicas, pois a cavidade nasal é a primeira região do trato respiratório a ser exposta a aeroalérgenos, irritantes e poluentes; sendo de fácil acesso para coleta de amostra de material para estudos.

Apesar das vantagens da coleta de amostra pelo lavado nasal, as células obtidas são predominantemente de origem epitelial, o que limita sua aplicação na avaliação do remodelamento da via aérea, o qual pode ser estudado por amostras de biópsia da mucosa nasal, que apesar de ser método mais invasivo, pode subsidiar informações sobre o grau de lesão epitelial, infiltrado inflamatório e espessamento da membrana basal.

A análise simultânea do infiltrado celular e do grau de ativação celular em amostras de secreção nasal e de biópsia de mucosa nasal mostra diferenças entre os dois compartimentos (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995). Portanto, o estudo do processo inflamatório em amostras simultaneamente obtidas pelo lavado nasal e da mucosa nasal, seja por biópsia ou material removido por turbinectomia, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na reação inflamatória nasal alérgica ou não alérgica.

A proposta do presente estudo é a avaliação da reação inflamatória na luz da cavidade nasal e concomitante análise histológica da mucosa nasal, com o intuito de quantificar a extensão da lesão epitelial e do espessamento da membrana basal. Foram também avaliadas as associações destas alterações à gravidade da apresentação clínica. O aprofundamento da compreensão do remodelamento nasal pode ser extrapolado para os achados na mucosa brônquica e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de monitoração e tratamento, para reduzir as consequências em longo prazo do processo inflamatório da via aérea.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de estudo observacional, analítico, transversal, com coleta de dados prospectiva.

#### 3.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi conduzido no Departamento de Pediatria, Serviço de Alergia e Imunologia Pediátrica, Serviço de Otorrinolaringologia e Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de 2008 a 2014. A coleta de dados foi realizada de 31/07/2008 a 14/09/2010 e a conclusão da análise do material em 12/02/2014.

O processamento e análise da celularidade das amostras do lavado nasal foram realizados nas dependências e com a estrutura de equipamentos do Serviço de Virologia HC-UFPR. A dosagem de albumina foi feita no Serviço de Análises Clínicas do HC-UFPR. As dosagens dos mediadores (IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$ ) foram feitas no Laboratório de Imunopatologia do HC-UFPR. O processamento das amostras para análise histopatológica foi feito no Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFPR.

#### 3.3 CASUÍSTICA

Em Curitiba a prevalência de rinoconjuntivite entre adolescentes, nos anos de 1995 e 2001, foi respectivamente de 14,2% e 17,2% (RIEDI *et al.*, 2005), sendo que rinite é queixa frequente entre pacientes em acompanhamento no ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas da UFPR. Foram então selecionados pacientes com indicação de correção cirúrgica de desvio de septo e (ou) turbinectomia por hipertrofia de cornetos, com sintomas de rinite alérgica ou não alérgica.

### 3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados como critérios de inclusão:

- a) Idade maior ou igual a 14 anos, ambos os sexos;
- b) Rinite alérgica ou não alérgica com ou sem asma associada;
- c) Indicação de correção cirúrgica de desvio de septo e (ou) turbinectomia por hipertrofia de cornetos, com sintomas de rinite.

### 3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Como critérios de exclusão foram considerados:

- a) Infecção de vias aéreas superiores e inferiores, respectivamente nas 2 e 4 semanas prévias à avaliação clínica;
- b) Rinossinusite bacteriana aguda;
- c) Intervalo sem uso de medicações previamente à avaliação clínica:
  - Corticóide sistêmico: 6 semanas;
  - Corticóide tópico nasal, cromoglicato dissódico e anti-histamínico tópico nasal: 1 mês;
  - Anti-histamínico oral: 1 semana (Cetotifeno: 4 semanas).

### 3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO

De acordo com os critérios de inclusão e exclusão, constituiu a população de estudo 56 pacientes. Foram incluídos os pacientes, que concordaram com a avaliação clínica e laboratorial e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, ou o responsável legal em caso de menor de idade (Anexo 1).

### 3.7 AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM

Os pacientes foram distribuídos em grupos de acordo com o diagnóstico de rinite e presença de atopia, tendo sido excluídos os casos com rinossinusite bacteriana aguda.

### 3.8 HIPÓTESE

H0: A hipótese de nulidade consistiu de que o processo inflamatório nasal é semelhante entre pacientes atópicos e não atópicos.

H1: A hipótese alternativa consistiu de que o processo inflamatório nasal é mais intenso em pacientes atópicos do que em não atópicos.

### 3.9 VARIÁVEIS DE ESTUDO

#### 3.9.1 Variável Dependente

Considerando a natureza associativa dos estudos transversais, a variável inflamação nasal foi posicionada como variável dependente.

#### 3.9.2 Variáveis Independentes

As principais variáveis independentes estudadas englobaram: caracterização da amostra, classificação da asma e da rinite, testes cutâneos, manifestações clínicas, rinoscopia e exame da celularidade da secreção nasal.



### 3.10 DEFINIÇÕES E DIAGNÓSTICOS

A rinite alérgica foi caracterizada por paroxismos de espirros, prurido nasal, congestão nasal e rinorréia. Ao exame clínico foi observada presença de respiração oral de suplência, prega no dorso nasal e congestão venosa infra-orbitária. Pela rinoscopia, a presença de aumento de volume de cornetos, coloração empalidecida e secreção mucosa nasal e pós-nasal (KALINER; LEMANSKE, 1992).

A rinite não alérgica também se apresenta pelos sintomas espirros, coriza, prurido e obstrução nasal, porém não mediada por reação de hipersensibilidade tipo 1 e os testes alérgicos são negativos (II Consenso brasileiro sobre rinites, 2006). O diagnóstico de asma incluiu dados de história, como a ocorrência de episódios repetidos de tosse, dispnéia e sibilância. A asma foi classificada pela frequência de sintomas em intermitente ou persistente, e, pela gravidade dos sintomas em leve, moderada ou grave (Quadro 2). A tolerância ao exercício, a medicação necessária para estabilização de sintomas, o número de visitas ao consultório e ao pronto-socorro, o número anual de cursos de corticóide sistêmico, o número de hospitalizações por asma e a necessidade de ventilação mecânica também foram utilizados para classificar a gravidade de cada caso (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2006; IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

#### 3.10.1 Glossário de termos

**Atopia:** Predisposição herdada ao desenvolvimento de sensibilização a alérgenos, mediada por IgE.

**Alergia:** Desenvolvimento de sintomas por reação de hipersensibilidade imediata (Tipo I) à exposição a alérgenos.

**Remodelamento** representa um processo dinâmico de reparo a uma lesão inflamatória, resulta em reconstituição tissular normal ou patológica.

QUADRO 3 – CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA ASMA §

SINTOMAS	INTERMITENTE ¥	PERSISTENTE		
		Leve	Moderada	Grave
	Raros	Semanais	Diários	Diários ou contínuos
Despertar noturno	Raros	Mensais	Semanais	Quase diários
Necessidade de beta2-agonista para alívio	Rara	Eventual	Diária	Diária
Limitação de atividades	Nenhuma	Presente nas exacerbações	Presente nas exacerbações	Contínua
Exacerbações	Raras	Afeta atividades e o sono	Afeta atividades e o sono	Frequentes
VEF1 ou PFE	≥ 80% previsto	≥ 80% previsto	60-80% previsto	≤ 60% previsto
Variação VEF1 ou PFE	< 20%	< 20-30%	> 30%	> 30%

FONTE: IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA (2006)

NOTA: § Classificar o paciente sempre pela manifestação de maior gravidade ¥ Paciente com asma intermitente, mas com exacerbações graves, devem ser classificados como tendo asma persistente moderada. VEF1: volume expiratório forçado no 1º segundo; PFE: pico de fluxo expiratório

A caracterização do paciente atópico foi realizada de acordo com os seguintes critérios:

- História pessoal de rinite alérgica associada ou não à asma brônquica (ou) eczema atópico;
- Teste cutâneo alérgico positivo para os alérgenos: *Dermatophagoides pteronyssinus* (e/ou) *Lolium perenne*.

A classificação da gravidade da rinite foi realizada por um escore adaptado de sinais e sintomas (Quadro 3), numa escala de 0 a 3 e pontuação máxima de 24 (MELTZER, 1988; MELTZER *et al.*, 2006).

QUADRO 4 – CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA RINITE – SINTOMAS E SINAIS

ESCORE	SINTOMAS			
	Prurido/espirros	Obstrução nasal	Secreção/Função	Secreção pós-nasal/ <i>snorting</i>
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1 (Leve)	1-4 espirros/dia; prurido ocasional	Obstrução parcial sem desconforto	Ocasional; 1-4x/dia	Desconforto leve na orofaringe
2 (Moderado)	5-10 espirros/dia; prurido incômodo, acessos com duração $\geq 30$ min	Obstrução resulta em respiração bucal	Acessos diários; 5-10x/dia	Pigarro incômodo
3 (Grave)	>10; acessos interferem com concentração ou sono	Obstrução completa; interfere com sono, olfato e voz	Contínua	Frequente; acarreta tosse ou engasgo
ESCORE	SINAIS			
	Coloração da mucosa (cornetos)	Aumento de volume de cornetos	Secreção nasal	Oroscopia
0	Rósea	Ausente	Ausente	Normal
1 (Leve)	Leve hiperemia ou róseo-pálida	Aumento de volume de corneto inferior ou médio, bloqueio nasal parcial	Pouca secreção hialina	Leve hiperemia de orofaringe (OF) posterior
2 (Moderado)	Hiperemia ou palidez	Aumento de volume de corneto induz bloqueio de uma ou ambas narinas	Acúmulo de secreção no corneto ou na passagem nasal	Hiperemia de OF; aspecto folicular
3 (Grave)	Aspecto inflamado ou palidez acinzentada	Aumento de volume de cornetos; oclusão de uma ou ambas as narinas	Profusa; preenche passagem nasal	Profusa drenagem mucosa na OF posterior

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Escala de 0 a 3: máximo de 24 pontos

### 3.11 PROCEDIMENTOS

#### 3.11.1 Exames complementares

##### 3.11.1.1 Teste cutâneo alérgico

A técnica empregada para os testes cutâneos foi a punção com agulha descartável. Foram aplicadas as gotas dos extratos alergênicos e das soluções controle, com espaçamento de 2cm entre elas, na superfície volar do antebraço (BERNSTEIN; STORMS, 1995; BOUSQUET *et al.*, 2001). A punção foi feita com introdução da agulha, com angulação de 20°, através da gota na pele. Foram empregados os extratos alergênicos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, 5000BAU/mL (Unidades Alergênicas Bioequivalentes) e de *Lolium perenne* (10.000BAU/mL), provenientes da Hollister-Stier®. As soluções controle foram histamina na concentração 1mg/mL (controle positivo) e solução salina 0,9% (controle negativo), tendo sido feita a leitura em 15 minutos após a aplicação do teste.

A gradação da reação do teste cutâneo alérgico foi feita pela medida do halo de eritema e maior diâmetro da pápula, em relação às medidas das reações ao controle negativo. A reação foi considerada negativa (0) quando ausente ou na presença de halo de eritema e diâmetro de pápula medido em milímetros, classificada como (+)=1mm; (++)=1-3mm; (+++)=3-5mm; (++++)=>5mm de diâmetro da pápula, acima da reação ao controle de solução salina. O teste foi considerado positivo a partir da medida de pápula maior ou igual a 3mm com halo de eritema, em relação ao controle negativo (BERNSTEIN; STORMS, 1995; BOUSQUET *et al.*, 2001).

O material utilizado incluiu:

- a) Agulhas descartáveis 13x4,5 B-D Becton Dickson® Indústrias Cirúrgicas, S.A.;
- b) Fosfato de histamina 2,75mg/mL, correspondendo a 1mg/mL de histamina, da Eli Lilly Company®, USA;
- c) Extratos alergênicos (Hollister-Stier®, Spokane, Washington - USA):
  - *Dermatophagoides pteronyssinus* (5000AU);

- *Lolium perenne* (10.000BAU/mL).

### 3.11.1.2 Avaliação da celularidade e mediares do lavado nasal

#### a) Lavado nasal

O fluido do lavado nasal foi obtido pela instilação nasal de soro fisiológico (0,9%) à temperatura ambiente. O volume instilado foi de 5mL por narina. O paciente mantinha a cabeça em extensão de aproximadamente 30°, ocluindo a nasofaringe pela língua com elevação do palato mole, durante uns 10 segundos. A seguir, após flexão cervical, o material era coletado em tubo de polipropileno graduado de 15mL. Procedeu-se a mensuração do volume recuperado e quando necessário repetiu-se a coleta, caso o volume recuperado fosse inferior a 10mL. Durante todo o período de coleta e processamento o material permaneceu acondicionado em recipiente de isopor e com gelo (NACLERIO *et al.*, 1983; CRUZ *et al.*, 1993). A contagem de qualquer tipo celular nas amostras de secreção nasal não se altera à instilação de solução salina (PELIKAN; PELIKAN-FILİPEK, 1989).

A amostra era homogeneizada por agitação e submetida à centrifugação (1000giros por minuto/5minutos), em centrífuga refrigerada (Figura 2), desta maneira apenas 0,01% das células permanecem no sobrenadante (BASCOM *et al.*, 1988).

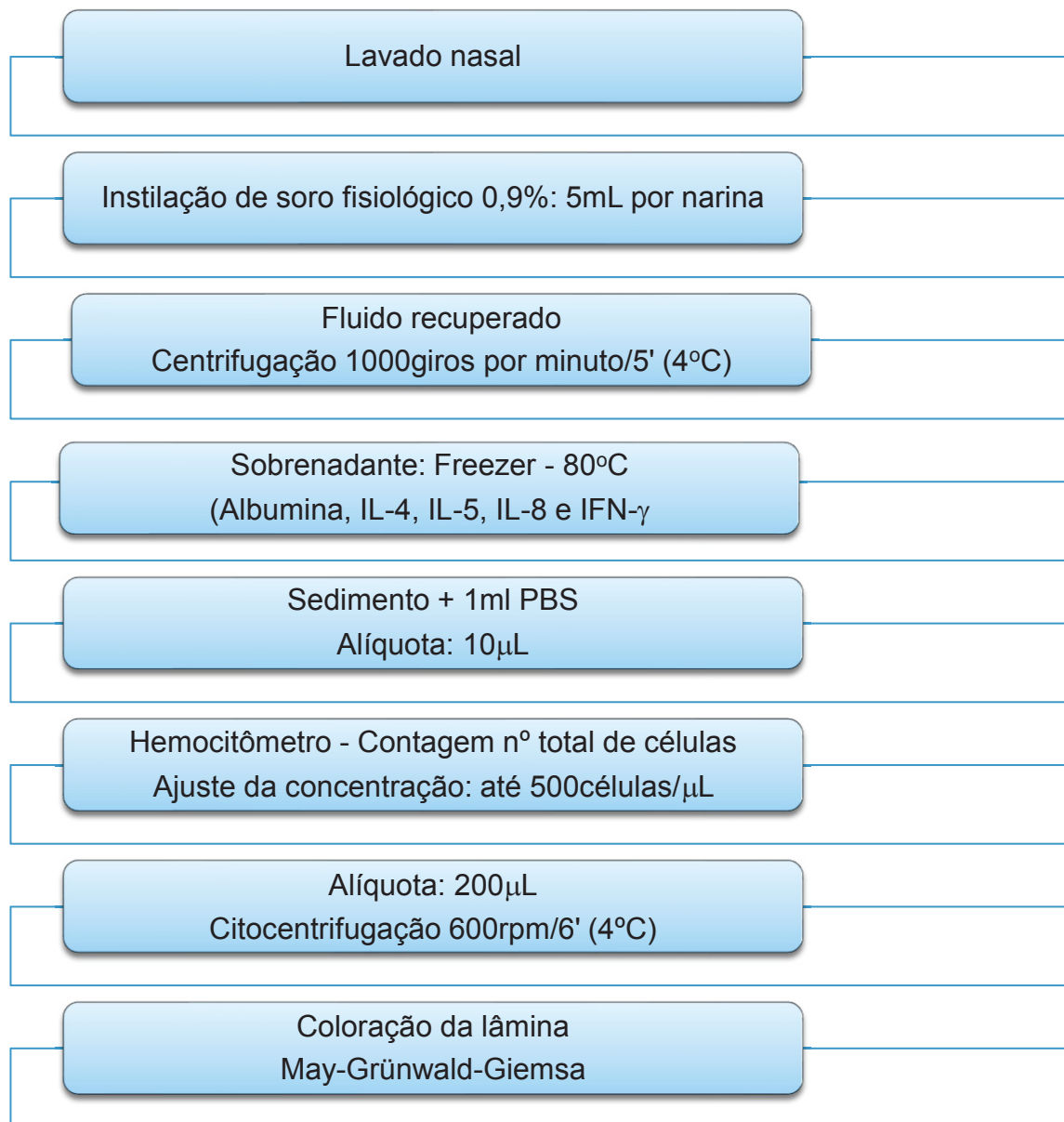


FIGURA 2 –ETAPAS DO LAVADO NASAL E ANÁLISE DO SEDIMENTO

FONTE: o autor (2014)

#### b) Determinação de mediadores

O sobrenadante do material inicialmente centrifugado foi estocado à temperatura de - 80°C para determinação de mediadores. A análise quantitativa de albumina no fluido do lavado nasal (FN) foi feita por imunoensaio turbidimétrico, que usa anticorpos policlonais contra albumina humana (Microalbumina MULTIGENT – Abbott Laboratórios dos Brasil Ltda®). A concentração de albumina no FN foi calculada em relação a uma curva padrão, cujos limites eram de 5 a 500µg/mL, com

amostras em duplicata. O limite de detecção era de 1,0µg/mL e o volume de amostra analisado foi de pelo menos 25µL.

As concentrações das interleucinas (IL) e do IFN-γ foram determinadas pela técnica quantitativa de *sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA MAX™ Set Deluxe) conforme orientação do fabricante Biolegend® (San Diego, California). Uma placa recoberta com anticorpo monoclonal específico foi preenchida com 50µL de cada amostra, onde a IL e/ou IFN-γ ligam-se ao anticorpo de captura imobilizado; seguida pela adição do anticorpo de detecção anti-interleucina (4, 5 ou 8) ou anti-IFN-γ humano e depois peroxidase, produzindo uma reação anticorpo-antígeno-anticorpo “*sandwich*”. Após incubação e lavagem para remoção das frações livres, acrescentou-se o substrato e uma reação colorimétrica ocorreu proporcionalmente às respectivas concentrações de interleucinas ou de IFN-γ nas amostras do fluido nasal, com determinações feitas em duplicata. Os limites de detecção do método eram respectivamente para IL-8 (31,2 a 2000pg/mL), IL-5 (2 a 125pg/mL), IL-4 (3,9 a 250pg/mL) e para IFN-γ (15,6 a 1000pg/mL).

### c) Citologia nasal

O sedimento obtido foi novamente suspenso em 1mL de solução salina tamponada com fosfato e homogeneizado por agitação, desta forma obtendo-se uma boa dispersão do muco. Uma alíquota de 10µL foi usada para preencher a câmara de contagem de células no hemocitômetro de Neubauer, tendo sido consideradas no mínimo 100 células, ou o número de células em 9 quadrados (BASCOM *et al.*, 1988; CIPRANDI *et al.*, 1994).

Foram contadas todas as células nucleadas, inflamatórias e epiteliais presentes nos quatro quadrados periféricos, os quais eram compostos por 16 quadrados menores e no retículo central composto por 25 quadrados menores. A leitura foi feita em microscópio com aumento de 100x ou de 400x.

A determinação do número total de células/mL da suspensão original foi feita pela seguinte fórmula:

Número total de células/mL = [(Número de células contadas) ÷ (Número de quadrados contados)] x [Fator de conversão da câmara de contagem] x [Fator de diluição]

O fator de conversão da câmara de contagem (0,1mm de espessura) do hemocítometro de Neubauer era de 10.000. O fator de diluição foi calculado pela razão entre o volume final do sedimento diluído pelo volume inicial do sedimento.

A viabilidade das células do lavado nasal, estimada pela análise da incorporação do corante *Trypan blue* pelas células não viáveis, evidenciou uma média de 72% (58 – 93%) de células viáveis, após todas as etapas do processamento do lavado nasal. A média da razão entre células viáveis e não viáveis foi de 2,6:1 (KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001).

À contagem de células no hemocítometro de Neubauer, foi ajustada a concentração em até 500células/ $\mu$ L. Desta amostra retirou-se uma alíquota de 200 $\mu$ L, a qual era citocentrifugada (Citocentrífuga LABHO® CT-12) a 600rpm por 6 minutos para obtenção do concentrado de células em lâminas (BASCOM *et al.*, 1988; CRUZ *et al.*, 1993).

#### d) Contagem diferencial de células

As lâminas contendo material citocentrifugado foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa, para contagem diferencial em microscópio com aumento de 400x a 1000x, foram contadas 100 células. A leitura das lâminas foi feita pelo investigador.

Foram contadas 100 células, tendo sido considerados os eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais. O número total/mL de cada tipo celular foi calculado pelo produto da contagem total de células/mL e a fração obtida na contagem diferencial (BASCOM *et al.*, 1988; CRUZ *et al.*, 1993).

#### 3.11.1.3 Avaliação histopatológica

As amostras da mucosa dos cornetos nasais inferiores foram obtidas por procedimento de turbinectomia ou nos pacientes submetidos à correção de desvio de



septo por biópsia de mucosa da ponta anteroinferior dos cornetos inferiores (LIM,; TAYLOR; NACLERIO, 1995). Por ser a porção anterior do corneto inferior mais exposta ao fluxo aéreo, local onde ocorre maior impacto de aeroalérgenos e irritantes, torna este o local mais apropriado para se estudar o processo inflamatório da mucosa nasal (AUGUSTO *et al.*, 1999).

No procedimento cirúrgico de turbinectomia parcial do corneto nasal inferior (ANSELMO-LIMA, 1988) foi coletada a maior quantidade de tecido e muco para minimizar o dano à amostra. As amostras foram identificadas na extremidade anterior, depois foram fixadas em formaldeído e o bloco de tecido embebido em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram feitos para confecção de lâminas (CHANEZ *et al.*, 1999; PONIKAU *et al.*, 2003). As colorações empregadas foram a hematoxilina-eosina (HE) para identificar leucócitos; *Periodic Acid-Schiff* (PAS) com digestão, para auxiliar na identificação das células caliciformes, glândulas mucosas e serosas; tricômico *Gomory* para auxiliar na identificação e medida da espessura do colágeno subepitelial, conforme rotina empregada no Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFPR.

Avaliação histopatológica foi feita pelo investigador com supervisão do patologista e orientador. Foi usado o microscópio ótico Olympus BX41® (Patrimônio Hospital de Clínicas 320678), para leitura das lâminas com aumento de 40x, 100x e 400x.

Para excluir artefatos causados pelo trauma da remoção cirúrgica, foram analisadas preferentemente as áreas de mucosa ainda recoberta por muco, evitando os campos com presença de hemácias extravasadas, bem como áreas com evidências de desprendimento iatrogênico do epitélio, desproporcionais a reação inflamatória subjacente.

Após inspeção microscópica de toda amostra, foram analisadas a lesão epitelial e as áreas com máximo espessamento de membrana basal. Espessamento da membrana basal foi medido a partir da base do epitélio ao limite externo da camada reticular (CHANEZ *et al.*, 1999).

O estadiamento da lesão epitelial e o espessamento da membrana basal foram avaliados e graduados de acordo com os parâmetros apresentados no Quadro 4 (PONIKAU *et al.*, 2003).

QUADRO 5 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL

ESTÁGIO	ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL (0-3)
Estágio 0	Epitélio intacto
Estágio 1	Ausência de cílios
Estágio 2	Erosão da camada superior de células, camada de células basais intacta
Estágio 3	Erosão completa do epitélio
ESTÁGIO	ESTADIAMENTO DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL (0-2)
Estadiamento do espessamento da membrana basal (0-2)	
Estágio 0	Membrana basal não visualizada
Estágio 1	Membrana basal visível, espessura inferior ou igual a 20µm
Estágio 2	Membrana basal visível, espessura superior a 20µm

FONTE: PONIKAU *et al.* (2003)

A mucosa da ponta anterior dos cornetos inferiores pode apresentar 3 tipos de epitélio (AUGUSTO *et al.*, 1999):

- a. epitélio respiratório pseudoestratificado colunar ciliado;
- b. epitélio intermediário de estratificado cuboidal misto a cuboidal escamoso;
- c. epitélio escamoso estratificado metaplásico.

#### 3.11.1.4 Material empregado para realização dos procedimentos

Para o lavado nasal

- a) Tubos de polipropileno graduados, de fundo cônico (15mL);
- b) Centrífuga eletrônica refrigerada, modelo 818, Drucker Company®;
- c) Micropipeta e ponteiros descartáveis (CELM® Barueri, SP);

- d) Solução salina tamponada com fosfato (PBS);
- e) Hemocítômetro – Câmara de Neubauer (Resistance W, Germany®);
- f) Microscópio (Wil Heebugg – 22310® – Switzerland);
- g) Citocentrífuga LABHO CT-12®;
- h) Lâminas para microscopia com área fosca, Glass técnica;
- i) Papel filtro (*Filter cards*, *Shandom Southern Instruments*, Inc. Pennsylvania, USA®);
- j) Corante May-Grünwald e Giemsa (Central de soluções do HC – UFPR).

Para determinação dos mediadores:

- a) Conjunto Imunoensaio turbidimétrico (Microalbumina MULTIGENT – Abbott Laboratórios dos Brasil Ltda®);
- b) Imunoensaio enzimático ELISA MAX™ Set Deluxe (Human IL-4, IL-5, IL-8, IFN- $\gamma$ ) - Biolegend® (San Diego, California);
- c) Freezer – 80° (Indrel – IULT 200®, São Paulo).

Para a histopatologia foram utilizados:

- a) Lâminas para microscopia, Glass técnica;
- b) Reagentes para colorações:
  - Hematoxilina-eosina (HE);
  - *Periodic Acid-Schiff* (PAS);
  - Tricômico *Gomory*;
- c) Microscópio ótico Olympus BX41® (Patrimônio Hospital de Clínicas 320678).

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram obtidos pelo pesquisador e registrados no instrumento de coleta de dados. Os dados foram digitados em planilha eletrônica (*Microsoft*

Excel®), conferidos e exportados para posterior análise estatística (*Statistica - Statsoft®*).

A estimativa da diferença de variáveis de distribuição assimétrica foi realizada por teste não-paramétrico, teste de Mann-Whitney.

A estimativa de diferença entre variáveis categóricas foi realizada pelos testes exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson.

Para todos os testes foi considerado um nível mínimo de significância de 5% e poder de teste mínimo de 90%.

O coeficiente de correlação de Pearson foi estimado para avaliar a associação entre variáveis contínuas.

A Curva Roc (*Receiver Operation Curve*) foi construída para estimativa do ponto de corte com maior sensibilidade e especificidade. Também foram estimadas a prevalência e razão de prevalência.

Regressão logística univariada foi realizada para estimar a probabilidade de atopia de acordo com a contagem de eosinófilos.

No cálculo do tamanho da amostra foram consideradas as principais variáveis do estudo, o suficiente para comparações com nível de significância inferior a 5%. O erro do tipo II pode ter ocorrido para as associações estimadas como não significativas em virtude do tamanho da amostra.

### 3.13 ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, conforme registro 755.174/2003-11 (Anexo 2).

### 3.14 CUSTOS, FOMENTOS E SERVIÇOS PARTICIPANTES

Os equipamentos utilizados na pesquisa fazem parte da estrutura dos laboratórios de análises clínicas e do serviço de anatomia patológica do HC-UFPR (Apêndice 1). A pesquisa obteve fomento da Fundação Araucária – Paraná, destinado à Pesquisa Básica e Aplicada, registrada sob o número de Protocolo 5877 – Chamada

1 – Convênio 016/2005 (Anexo 3). Este recurso foi utilizado para compra de materiais utilizados na pesquisa (Apêndice 2), seguindo todos os procedimentos legais instituídos pela UFPR. Os custos dos equipamentos utilizados na pesquisa estão apresentados no Apêndice 1.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS

Foram analisados os resultados de 56 amostras de pacientes com indicação de cirurgia para correção de desvio de septo e (ou) turbinectomia. Os pacientes foram agrupados de acordo com a presença de atopia. Na tabela 1 estão apresentados os dados demográficos, clínicos e a pontuação total de sintomas e sinais de rinite. Cirurgia para correção de desvio de septo foi realizada em 49 (87,5%) dos pacientes, dos quais 33 (67,3%) eram atópicos; turbinectomia foi realizada em 17 (30,3%) pacientes, dos quais 11 (65%) eram atópicos. Treze pacientes (23,0%) foram submetidos a ambos procedimentos simultaneamente.

TABELA 1– CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

CARACTERÍSTICAS	ATÓPICOS	NÃO ATÓPICOS	p
Número de casos (n)	36	20	
Idade (anos)	25 (14 – 54)	24 (17 – 58)	0,95 §
Masculino/Feminino	16/20	9/11	1,00 ¥
Asma (n)	2 (5%)	0	
Pontuação total do escore de rinite	9 (1 – 18)	6,5 (0 – 12)	0,01§

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Mediana (limites) § Teste de Mann-Whitney ¥ Teste exato de Fisher

Os testes cutâneos alérgicos, em pacientes com sintomas de rinite, foram negativos em 20/56 (36,0%) e positivos em 36/56 (64,0%). Nos atópicos o teste cutâneo alérgico foi positivo para *D. pteronyssinus* em 35/36 (97,0%), *L. perenne* em 18/36 (50,0%). O teste foi exclusivamente positivo ao *D. pteronyssinus* em 18/36 (50,0%) e ao *L. perenne* em apenas 1/36 (3,0%).

A coleta dos dados foi feita entre setembro/2008 e novembro/2009. Os pacientes com teste cutâneo positivo ao *L. perenne*, cujas amostras foram coletadas no período de estação polínica, num total de 6 casos, todos também com teste cutâneo positivo ao *D. pteronyssinus*, apresentaram mediana de pontuação de escore de rinite de 11,5 (5 a 14) e percentual de eosinófilos no lavado nasal de 5,5 (0 a 16),

todos com algum grau de lesão epitelial e espessamento de membrana basal detectáveis. À análise estatística, não houve diferença tanto na pontuação do escore de rinite ( $p = 0,26$ ), quanto no número de eosinófilos no lavado nasal ( $p = 0,48$ ), deste subgrupo de pacientes em relação aos demais pacientes atópicos, cujas respectivas medianas foram de 9 (1 a 18) para pontuação do escore de sintomas e 3% (0 a 66) para contagem de eosinófilos.

A mediana da pontuação total, ou seja, o somatório da pontuação de sintomas e sinais de rinite, dos 56 casos estudados foi de 9 e variou de 0 a 18, tendo sido significativamente maior nos atópicos ( $p = 0,01$ ) (Tabela 1). À análise isolada dos sintomas de rinite, nos atópicos a mediana da pontuação de sintomas foi 5 (0 – 8) e nos não atópicos 3,5 (0 – 8), enquanto a mediana da pontuação de sinais foi de 4 (1 – 11) nos atópicos e 3 (0 – 6) nos não atópicos. Em relação a gravidade da rinite pela pontuação de sintomas e sinais, de acordo com classificação apresentada no quadro 3, foi realizada a análise de frequência dos casos agrupados nas categorias 0 a 1 (ausente a leve) em comparação às categorias 2 a 3 (moderada a grave), conforme apresentado nas Tabelas 2 e 3.

Pela frequência de distribuição dos casos, os atópicos tenderam a apresentar maior proporção de sintomas prurido e espirros, embora no limite de significância ( $p = 0,05$ ). A frequência do sintoma obstrução nasal de grau moderado a grave, presente em 25/36 (69,0%) dos atópicos, não foi diferente em comparação aos não atópicos ( $p = 0,16$ ). À comparação dos grupos pela pontuação de sinais de rinite não se evidenciou diferenças. Aumento de volume de cornetos, de grau moderado a grave, pela rinoscopia foi observado em 22/36 (61,0%) dos atópicos e em 10/20 (50,0%) dos não atópicos ( $p = 0,57$ ).

TABELA 2 - FREQUÊNCIA DOS CASOS PELA PONTUAÇÃO DE SINTOMAS DE RINITE EM ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

ESCORE DE SINTOMAS	ATÓPICOS (n = 36)	NÃO ATÓPICOS (n = 20)	p
Prurido/espirros			
0 -1	19 (52,8%)	16 (80,0%)	0,05
2 – 3	17 (47,2%)	4 (20,0%)	
Obstrução			
0 -1	11 (30,5%)	10 (50,0%)	0,16
2 – 3	25 (69,4%)	10 (50,0%)	
Secreção/Função			
0 -1	28 (77,8%)	16 (80,0%)	1,00
2 – 3	8 (22,2%)	4 (20,0%)	
Secreção pós nasal			
0 -1	32 (88,9%)	18 (90,0%)	1,00
2 – 3	4 (11,1%)	2 (10,0%)	

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Teste exato de Fisher Gradação: 0 -1 (Ausente a leve); 2 – 3 (Moderado/grave)



TABELA 3 - FREQUÊNCIA DOS CASOS PELA PONTUAÇÃO DE SINAIS DE RINITE EM ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

ESCORE DE SINAIS	ATÓPICOS (n = 36)	NÃO ATÓPICOS (n = 20)	p
Alteração da coloração da mucosa dos cornetos			
0 -1	19 (52,8%)	13 (65,0%)	0,41
2 – 3	17 (47,2%)	7 (35,0%)	
Aumento de volume de cornetos			
0 -1	14 (38,9%)	10 (50,0%)	0,57
2 – 3	22 (61,1%)	10 (50,0%)	
Secreção nasal			
0 -1	31 (86,1%)	20 (100,0%)	0,14
2 – 3	5 (13,9%)	0 (0,0%)	
Oroscopia			
0 -1	34 (94,4%)	20 (100,0%)	0,52
2 – 3	2 (5,5%)	0 (0,0%)	

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Teste exato de Fisher Gradação de sinais: 0 -1 (Ausente a leve); 2 – 3 (Moderado/ grave)

Nos atópicos, ao se comparar os resultados pela gradação da intensidade da reação de pápula e eritema, não foi observada diferença nas reações aos extratos de *D. pteronyssinus* e *L. perenne*.

## 4.2 LAVADO NASAL

O lavado nasal forneceu amostra para análise da celularidade total e diferencial (eosinófilos, neutrófilos, células epiteliais e mononucleares), além da albumina e mediadores (IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$ ). Foram indetectáveis os níveis de IL-4, IL-5 e de IFN- $\gamma$ , possivelmente por serem lábeis e mínimas as quantidades destes mediadores em amostras coletadas sem o estímulo da provocação nasal com alérgenos. A contagem de células total e diferencial e as dosagens de albumina e IL-8 estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 - CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS E NÍVEIS DE ALBUMINA E IL-8 NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

LAVADO NASAL	ATÓPICOS (n = 36)	NÃO ATÓPICOS (n = 20)	p
Celularidade total	127.000 (10x10 <sup>3</sup> a 6.134 x10 <sup>3</sup> )	128.000 (24 x10 <sup>3</sup> a 682 x10 <sup>3</sup> )	0,90
Células epiteliais (%)	48 (8 a 98)	76 (10 a 100)	0,07
Eosinófilos (%)	3 (0 a 66)	1 (0 a 21)	< 0,01
Neutrófilos (%)	41,5 (0 a 87)	17,5 (0 a 83)	0,24
Mononucleares (%)	1(0 a 12)	1(0 a 7)	0,96
Albumina (µg/mL)	16 (5 a 338)	16,5 (5 a 105)	0,67
IL-8 (pg/mL)	80 (30 a 1300)	81,5 (30 a 604)	0,45

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Mediana (limites); Teste de Mann-Whitney

O número total de células do lavado nasal não foi diferente entre os pacientes, sejam atópicos ou não atópicos, mesmo com a exclusão de dois casos que se desviaram da curva de distribuição da celularidade. Nesta condição, com exclusão dos casos entre os atópicos, com contagem total de células superior a 953,3 x 10<sup>3</sup>, a mediana da celularidade total foi de 122.000x10<sup>3</sup>.

Na contagem diferencial das células (Figuras 3 e 4), o percentual de eosinófilos (Tabela 4; Gráfico 1), foi maior entre os atópicos (p < 0,01), mesmo à análise com exclusão de dois casos com contagem superior a 40%, respectivamente 47,0% e 66,0%, no grupo dos atópicos, ainda assim a mediana de eosinófilos permaneceu em 3% (0 a 16%). Três pacientes apresentaram contagem de eosinófilos superior a 20%, dois atópicos e um não atópico; nestes pacientes, a pontuação do

escore de rinite foi maior entre os atópicos (pontuação: 10 e 13), em relação ao paciente não atópico (pontuação: 5). As demais células contadas, entre elas epiteliais, neutrófilos e mononucleares, tiveram igual distribuição entre os pacientes, independente da presença de atopia. Embora a mediana de neutrófilos dos atópicos tenha sido maior, não foi estatisticamente diferente em relação aos pacientes não atópicos (Tabela 4, Figuras 3 e 4, Gráfico 1).

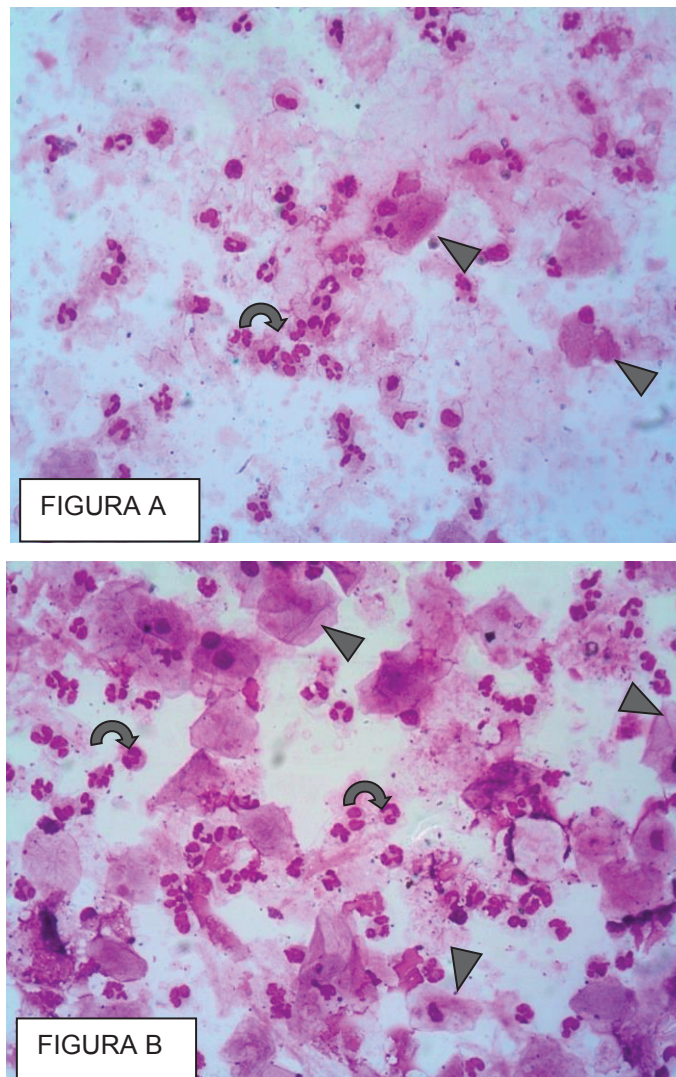


FIGURA 3 – IMAGENS DE LÂMINAS DE LAVADO NASAL CITOCENTRIFUGADO DE PACIENTE NÃO ATÓPICO COM RINITE, PRESENÇA DE CÉLULAS EPITELIAIS (PONTA DE SETA) E DE NEUTRÓFILOS (SETA CURVA)

FONTE: o autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO MAY-GRÜNWARD-GIEMSA (AUMENTO DE 400X)

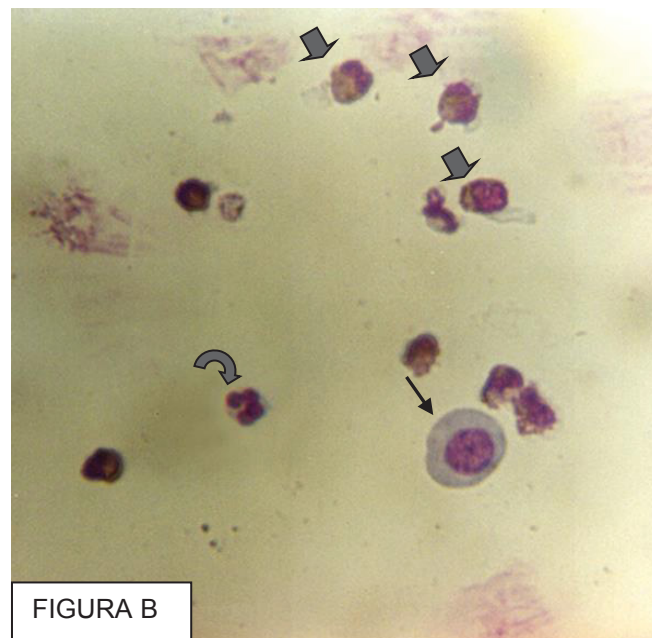
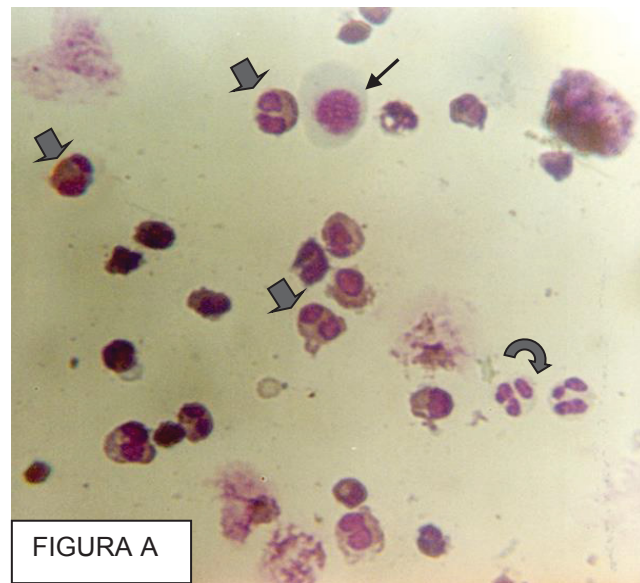


FIGURA 4 – IMAGENS DE LÂMINAS DE LAVADO NASAL CITOCENTRIFUGADO DE PACIENTE ATÓPICO COM RINITE, PRESENÇA DE CÉLULAS MONONUCLEARES (SETA ESTREITA), NEUTRÓFILOS (SETA CURVA) E EOSINÓFILOS (SETA CHEIA)

FONTE: o autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO MAY-GRÜNWARD-GIEMSA (AUMENTO DE 400X)

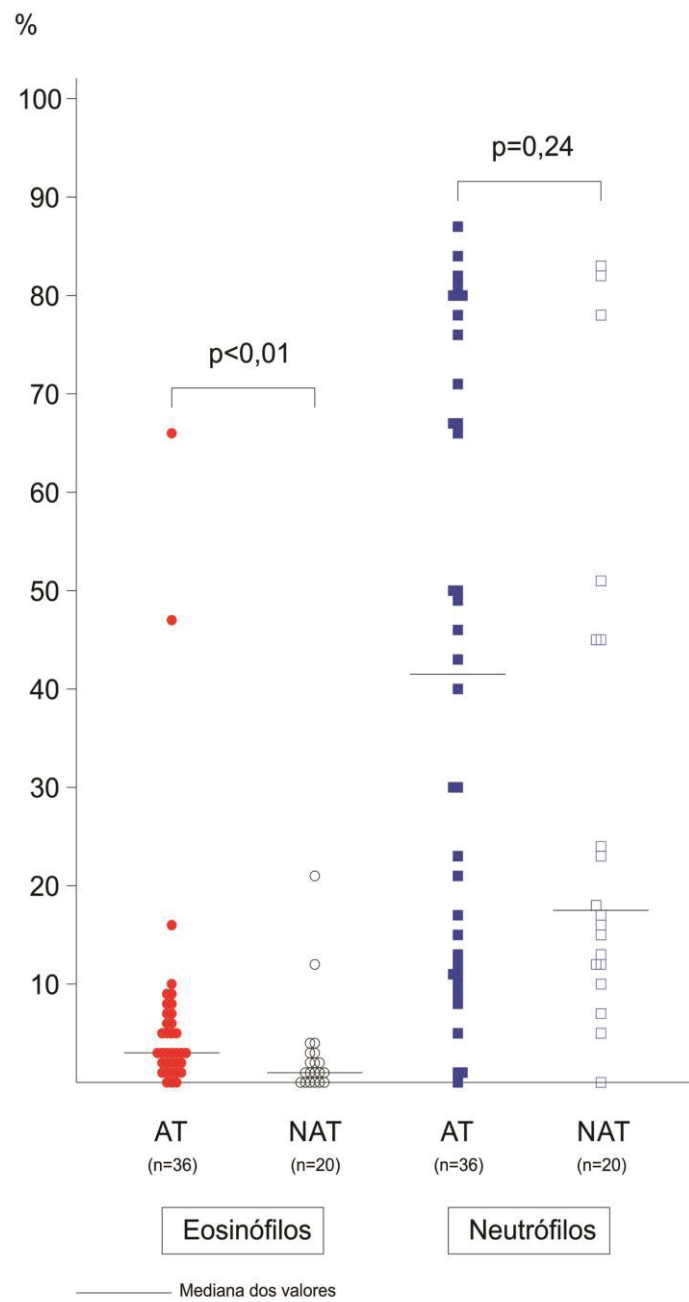


GRÁFICO 1 – CONTAGEM DIFERENCIAL DE EOSINÓFILOS E NEUTRÓFILOS  
NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: — Mediana (limites); Teste de Mann-Whitney

Foram dosadas as concentrações de albumina ( $\mu\text{g/mL}$ ) e de interleucina-8 ( $\text{pg/mL}$ ) no sobrenadante das amostras do lavado nasal, porém não houve diferença entre atópicos e não atópicos (Tabela 4; Gráficos 2 e 3). A representação gráfica dos níveis de IL-8 foi feita em escala logarítmica pela amplitude dos limites detectados.

Os níveis de IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  foram indetectáveis no sobrenadante do lavado nasal, o que pode ser atribuído à labilidade e (ou) à mínima quantidade destas citocinas nas amostras de lavado nasal destes pacientes. Também devido a coleta ter sido realizada sem o estímulo da provocação nasal.

Não houve correlação entre as variáveis celularidade total, diferencial, albumina e IL-8 nas amostras do lavado nasal, mesmo com exclusão dos casos fora dos limites da distribuição (*outliers*) (Apêndices 3 e 4).

Asma foi diagnosticada em dois pacientes, ambos atópicos cujas características estão apresentadas no Apêndice 5.

A contagem diferencial de células no lavado nasal em pacientes com pontuação de escore de sintomas prurido/espirros de 0 a 1, ou seja, ausente a leve intensidade, também evidenciou maior proporção de eosinófilos, nas amostras dos atópicos ( $p = 0,01$ ). Entretanto, não houve diferença na proporção de neutrófilos, bem como da relação eosinófilo/neutrófilo, no lavado nasal destes casos com pontuação de escore de sintomas prurido/espirros de 0 a 1 (Tabela 5).

TABELA 5 - CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS NO LAVADO NASAL DOS PACIENTES COM MENOR PONTUAÇÃO DO ESCORE DE SINTOMAS PRURIDO/ESPIRROS (0 – 1)

CÉLULAS	ATÓPICOS (n=19)	NÃO ATÓPICOS (n=16)	p
Eosinófilos (%)	3 (0 a 66)	1 (0 a 21)	0,01
Eosinófilos absoluto ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	4,4 (0 a 629,2)	0,87 (0 a 131,4)	0,01
Neutrófilos (%)	40 (0 a 82)	16,5 (0 a 83)	0,06
Neutrófilos absoluto ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	54,6 (0 a 261,28)	17,4 (0 a 149,76)	0,12
Relação Eosinófilo/Neutrófilo	0,08 (0 a 47)	0,06 (0 a 0,88)	0,5

FONTE: o autor (2014)

NOTA: Mediana (limites); Teste de Mann-Whitney

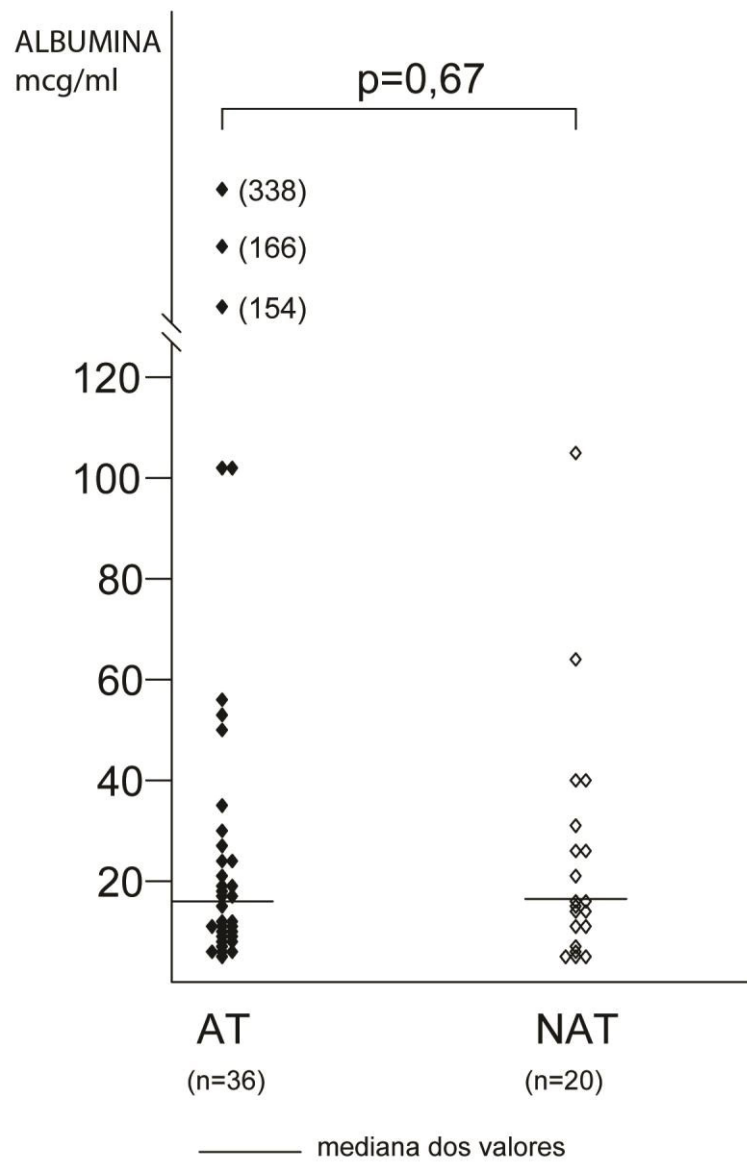


GRÁFICO 2 – NÍVEL DE ALBUMINA ( $\mu\text{g/mL}$ ) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: — Mediana (limites); Teste de Mann-Whitney

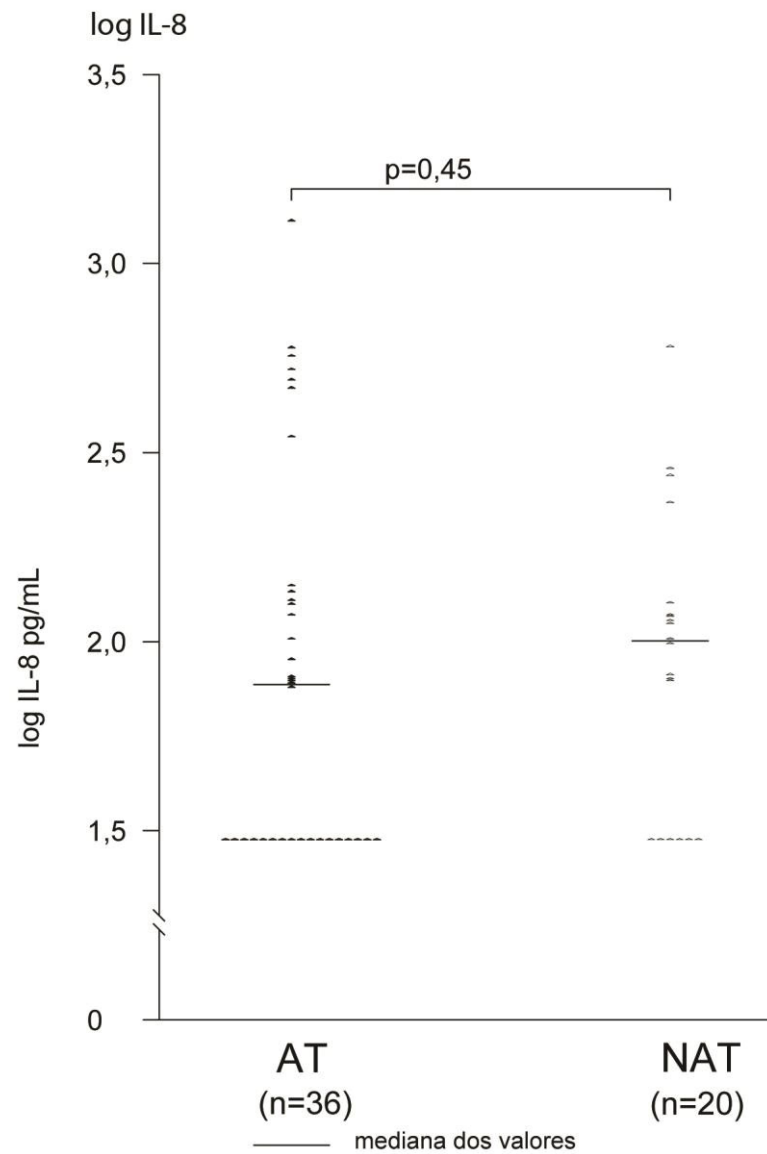


GRÁFICO 3 – NÍVEL DE IL-8 (pg/mL) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: — Mediana (limites); Teste de Mann-Whitney



À análise pelo teste qui-quadrado com tendências lineares, dos casos agrupados por faixas de número percentual de eosinófilos na secreção nasal (Tabela 6), a maioria dos não atópicos apresentou contagem na faixa de 0 a 2%, onde se concentraram 14/20 (70,0%) dos casos, em relação a 13/36 (36,0%) dos atópicos ( $p = 0,01$ ). A frequência dos casos com contagem de eosinófilos superior a 4%, foi maior entre os atópicos, observada em 16 (45,0%) destes pacientes. Apenas dois (10,0%) dos não atópicos, apresentaram contagem de eosinófilos superior a 4,0%. Nestes dois casos, as contagens obtidas foram de 12 e 21% de eosinófilos, com contagem total de células nas amostras de lavado nasal respectivamente de  $74 \times 10^3$  e  $624 \times 10^3$ . No Gráfico 4 estão representadas as frequências dos casos agrupados por faixas de contagem de eosinófilos no lavado nasal.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS POR FAIXAS DE NÚMERO DE EOSINÓFILOS NA SECREÇÃO NASAL

EOSINÓFILOS (%)	ATÓPICOS (n = 36)	NÃO ATÓPICOS (n = 20)	p
0 a 2	13 (36%)	14 (70%)	0,01
> 2 a 4	7 (19%)	4 (20%)	
> 4 a 6	6 (17%)	0 (0%)	
> 6	10 (28%)	2 (10%)	

FONTE: o autor (2014)

NOTA: Teste Qui-quadrado com tendências lineares

Na construção da curva ROC (*Receiver Operation Curve*) considerando-se como variável dependente a atopia e como variável independente a contagem de eosinófilos, observou-se área sob a curva de 0,71 (IC 95% = 0,57 a 0,82). O ponto de corte apontado com maiores índices de sensibilidade e especificidade foi de 4% de eosinófilos no lavado nasal, que diferenciou atópicos de não atópicos. Neste critério a sensibilidade foi de 44% e a especificidade foi de 90% (Gráfico 5).

No modelo de regressão logística univariada, considerando como variável dependente a atopia e variável independente a contagem de eosinófilos, observou-se no ponto de corte 4, uma probabilidade de 80% de atopia, aumentando para 100%

com contagem de 10% de eosinófilos, atingindo um platô a partir deste valor (Gráfico 6).

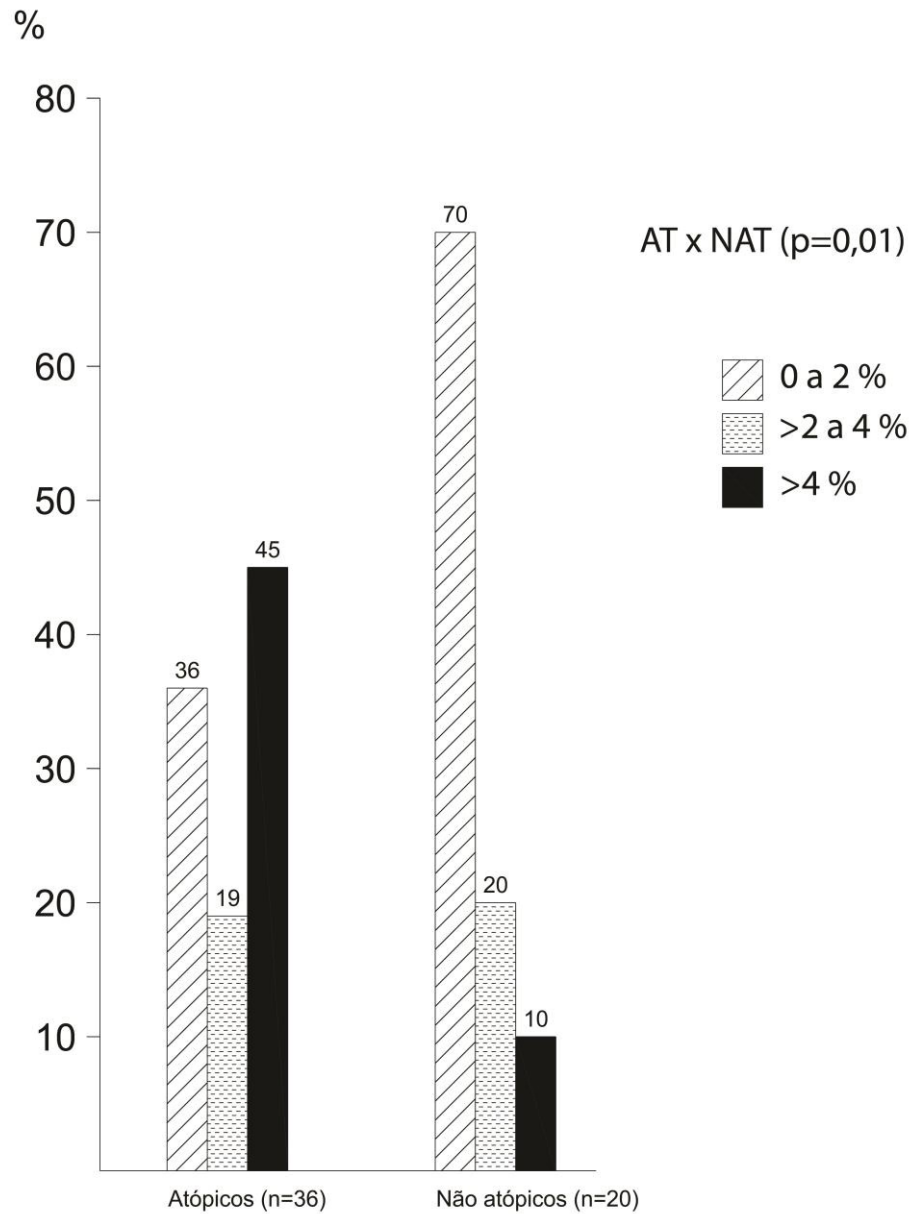


GRÁFICO 4 – FREQUÊNCIA DOS CASOS DISTRIBUÍDOS POR FAIXAS DE PERCENTUAL DE NÚMERO DE EOSINÓFILOS NO LAVADO NASAL

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Teste Qui-quadrado com tendências lineares

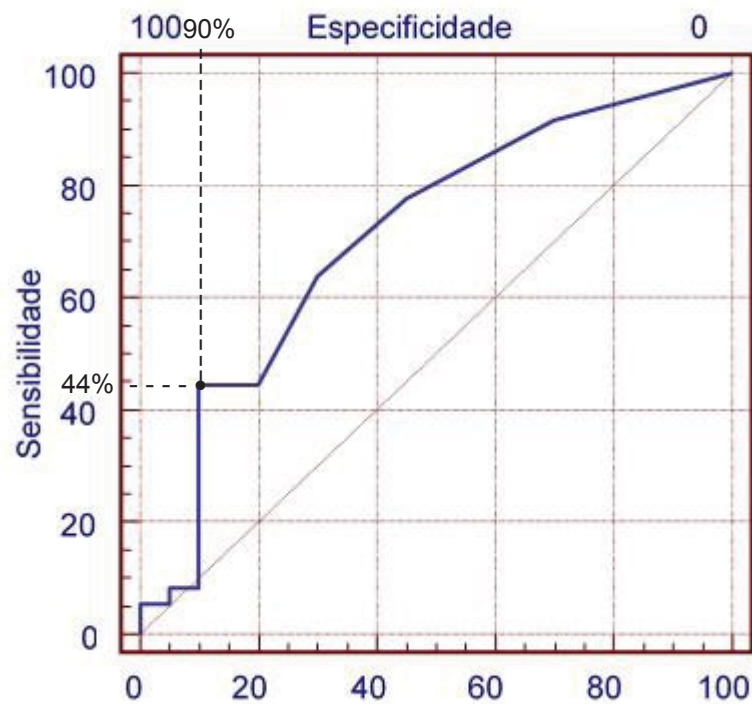


GRÁFICO 5 – CURVA ROC – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO LAVADO NASAL PARA O DIAGNÓSTICO DE ATOPIA

FONTE: O autor (2014)

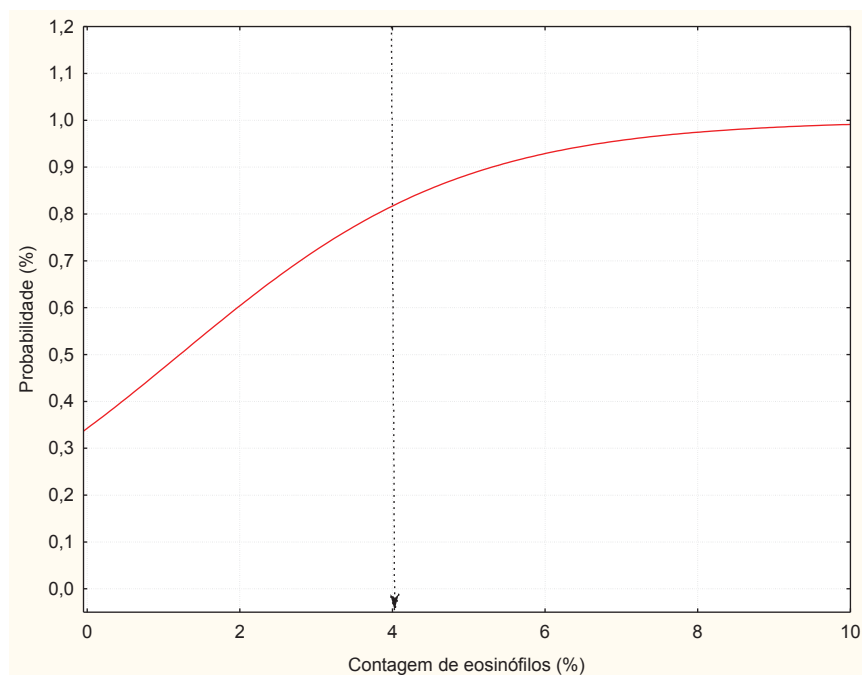


GRÁFICO 6 – PROBABILIDADE DE ATOPIA DE ACORDO COM A CONTAGEM PERCENTUAL DE EOSINÓFILOS NO LAVADO NASAL

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Regressão logística:  $p < 0,001$ ; Ponto de corte: 4%

Atópicos com contagem de eosinófilos no lavado nasal maior ou igual a 4% representaram 16/36 (44,4%) dos casos, contra 4/20 (20,0%) dos não atópicos.

#### 4.3 HISTOPATOLOGIA

As amostras da mucosa dos cornetos foram analisadas quanto a integridade do epitélio e presença de espessamento da membrana basal.

As frequências de distribuição dos casos pela análise histopatológica das amostras da mucosa dos cornetos inferiores em relação ao grau de lesão epitelial e de espessamento da membrana basal estão apresentadas na Tabela 7. Algum grau de lesão epitelial foi achado mais frequente entre os atópicos ( $p=0,02$ ).

TABELA 7 - FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE ACORDO COM GRAU DE LESÃO EPITELIAL E ESPESSAMENTO DE MEMBRANA BASAL

ESTÁGIOS	LESÃO EPITELIAL		ESTÁGIOS	ESPESSAMENTO DE MB	
	Atópicos (n=36)	Não atópicos (n=20)		Atópicos (n=36)	Não atópicos (n=20)
Estágio 0 Epitélio intacto	2 (5,5%)	7 (35%)	Estágio 0 MB não visualizada	12 (33,3%)	9 (45%)
Estágio 1 Ausência de cílios	25 (69,4%)	8 (40%)	Estágio 1 MB: espessura $\leq 20\mu\text{m}$	21 (58,3%)	9 (45%)
Estágio 2 Erosão da camada superior de células, camada basal intacta	8 (22,2%)	4 (20%)	Estágio 2 MB: espessura $> 20\mu\text{m}$	3 (8,3%)	2 (10%)
Estágio 3 Erosão completa do epitélio	1 (2,8%)	1 (5%)			

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Teste  $\chi^2$  para tendências lineares

Lesão epitelial:  $p = 0,02$  Espessamento de membrana basal:  $p = 0,62$

Na maioria das amostras o epitélio encontrado foi do tipo pseudoestratificado colunar ciliado. O infiltrado no córion/lâmina própria foi predominantemente mononuclear, linfoplasmocitário (Figuras 5 e 6).

Em algumas amostras foi observada a presença em algumas áreas de epitélio displásico (n = 1), transicional para escamoso não queratinizado (n = 7) (Figura 7).

Para análise estatística os casos foram categorizados de acordo com a presença de lesão epitelial, como estágio 0 (sem lesão epitelial) ou estágios de 1 a 3 (desde ausência de cílios, erosão da camada superior de células até a erosão completa do epitélio) (Figuras 8 a 13). Desta forma, 94% dos atópicos apresentaram algum grau de lesão epitelial ( $p < 0,01$ ) (Tabela 8).

Erosão completa do epitélio, estágio 3 na classificação de lesão epitelial, foi detectada em dois pacientes, cujas características estão apresentadas no Apêndice 6, ambos não asmáticos.

Em relação ao parâmetro espessamento da membrana basal, os casos foram agrupados como estágio 0 (membrana basal não visualizada) ou estágios de 1 a 2 (membrana basal visível, com espessamento) (Figuras 8 a 13), desta forma atópicos e não atópicos se distribuíram com igual frequência quanto ao grau de espessamento da membrana basal ( $p = 0,40$ ) (Tabela 8).

Nesta amostra, entre os atópicos, a prevalência de lesão epitelial foi de 94,4% e a razão de prevalência de lesão epitelial foi 1,4 vezes maior nos atópicos ( $p < 0,01$ ). A prevalência de lesão à membrana basal foi de 67,0%, indicando nos atópicos a chance de apresentar algum grau de espessamento de membrana basal 1,2 vezes maior que nos não atópicos, entretanto sem relevância do ponto de vista estatístico ( $p = 0,40$ ) (Tabela 8).

TABELA 8 - FREQUÊNCIA DOS CASOS AGRUPADOS PELO GRAU DE LESÃO EPITELIAL E DE ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL EM ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

ESTADIAMENTO	ATÓPICOS (n = 36)	NÃO ATÓPICOS (n = 20)	p
Lesão epitelial			
0	2 (5%)	7 (35%)	< 0,01
1 - 3	34 (94%)	13 (65%)	
Espessamento da MB			
0	12 (33%)	9 (45%)	0,40
1 a 2	24 (67%)	11 (55%)	

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Teste exato de Fisher

Turbinectomia foi realizada em 17/56 (30,0%) dos pacientes, 11/17 (65,0%) atópicos e 6/17 (35,0%) não atópicos. Nestes pacientes, algum grau de lesão epitelial foi observado em 11/11 (100,0%) dos atópicos e 4/6 (66,6%) dos não atópicos. Por outro lado, espessamento da membrana basal, esteve presente em 10/11 (91,0%) dos atópicos e 3/6 (50,0%) dos não atópicos. Análise estatística não foi realizada neste subgrupo de pacientes, devido ao pequeno tamanho da amostra.

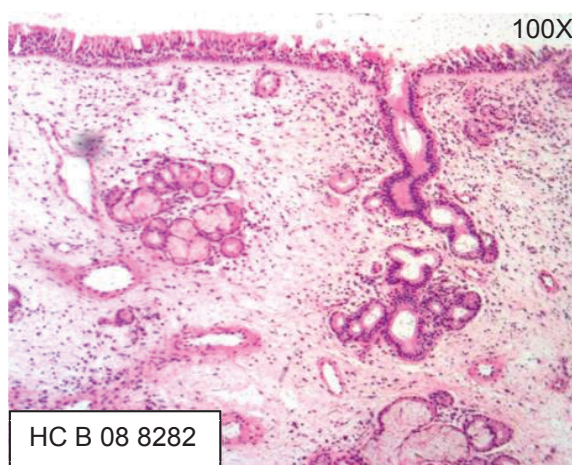


FIGURA 5 – EPITÉLIO PSEUDOESTRATIFICADO COLUNAR CILIADO, INFILTRADO NO CÓRION/LÂMINA PRÓPRIA PREDOMINANTEMENTE MONONUCLEAR LINFOPLASMOCITÁRIO, PRESENÇA DE GLÂNDULAS SEROSAS E MUCOSAS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO HE

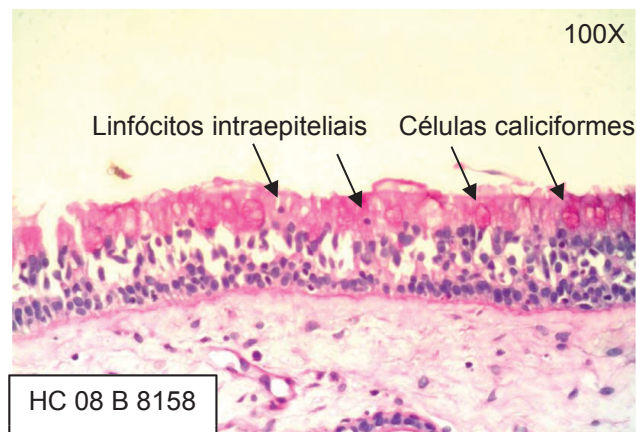


FIGURA 6 – EPITÉLIO PSEUDOESTRATIFICADO COLUNAR CILIADO, PRESENÇA DE CÉLULAS CALICIFORMES, DESTAQUE PARA LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO PAS

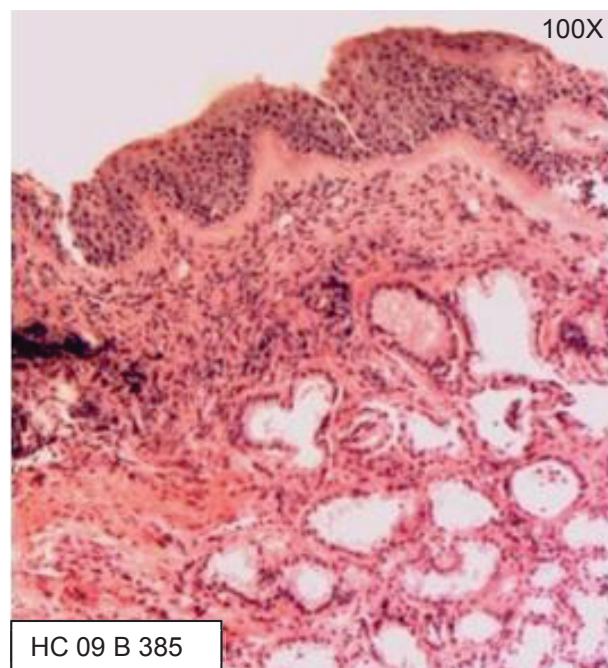


FIGURA 7 – EPITÉLIO TRANSICIONAL ESCAMOSO NÃO QUERATINIZADO, PRESENÇA DE GLÂNDULAS SEROSAS E MUCOSAS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO HE



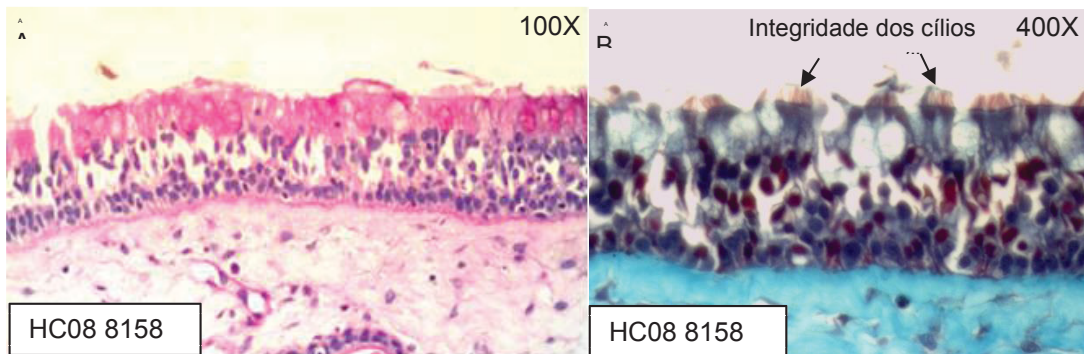


FIGURA 8 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 0 (EPITÉLIO INTACTO) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 0 (NÃO VISUALIZADA); DESTAQUE PARA INTEGRIDADE DOS CÍLIOS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO PAS (A) E GOMORI (B)

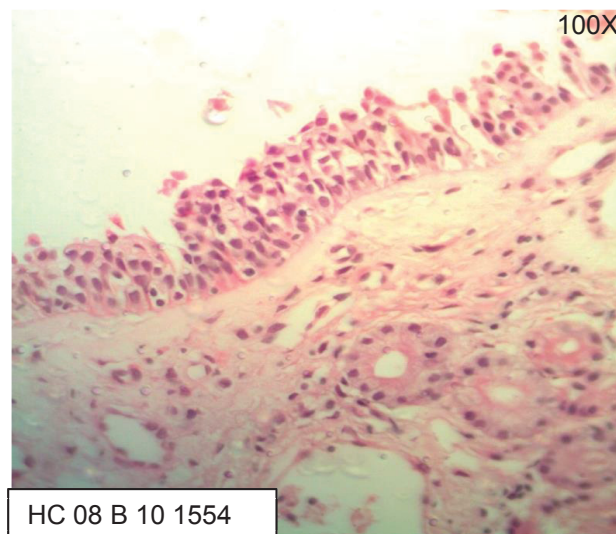


FIGURA 9 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 1 (AUSÊNCIA DE CÍLIOS) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 0 (NÃO VISUALIZADA)

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO HE



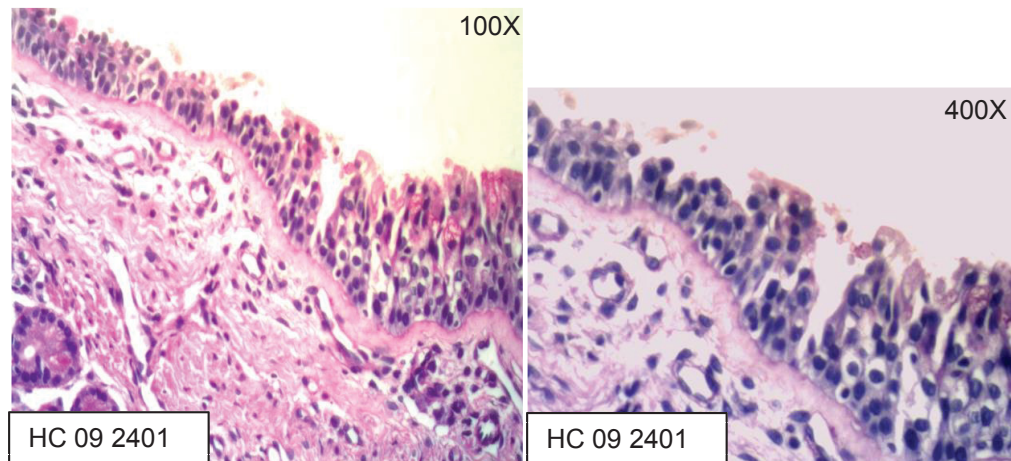


FIGURA 10 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 1 (AUSÊNCIA DE CÍLIOS) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 1 (MEMBRANA BASAL VISÍVEL, ESPESSURA INFERIOR OU IGUAL A 20 $\mu$ m)

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO PAS

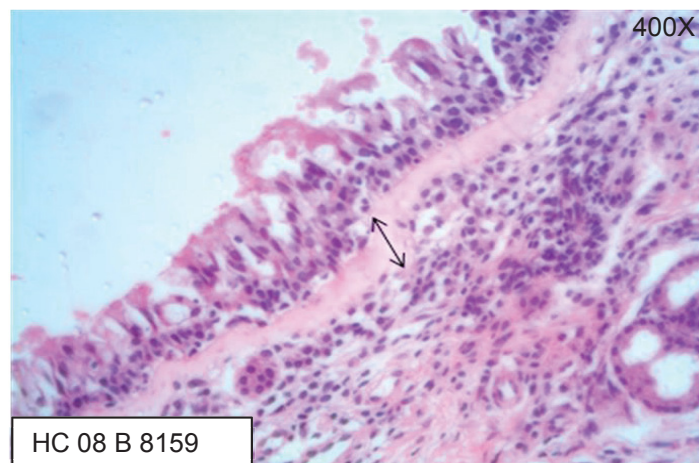


FIGURA 11 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 1 (AUSÊNCIA DE CÍLIOS) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 2 (MEMBRANA BASAL VISÍVEL, ESPESSURA SUPERIOR A 20 $\mu$ m)

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO HE

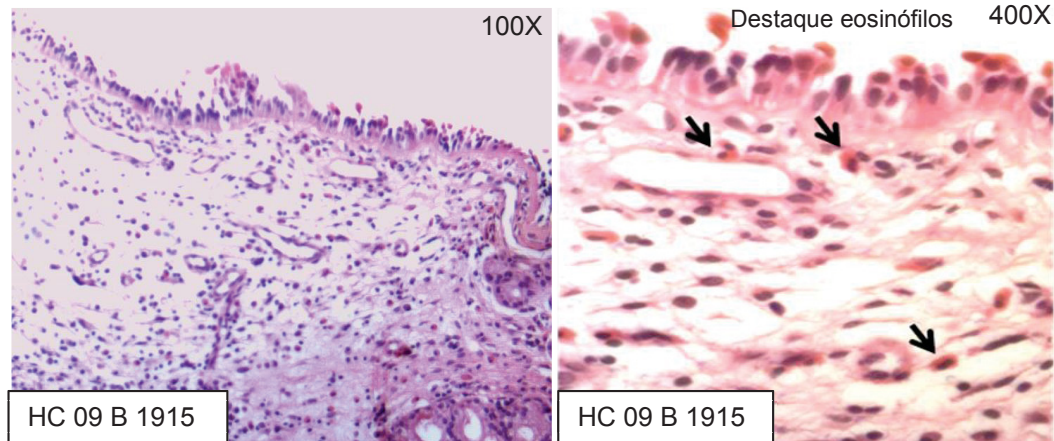


FIGURA 12 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 2 (EROSÃO DA CAMADA SUPERIOR DE CÉLULAS, CAMADA DE CÉLULAS BASAIS INTACTA) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 1 (MEMBRANA BASAL VISÍVEL, ESPESSURA INFERIOR OU IGUAL A 20 $\mu$ m); DESTAQUE PARA INFILTRAÇÃO DE EOSINÓFILOS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO HE

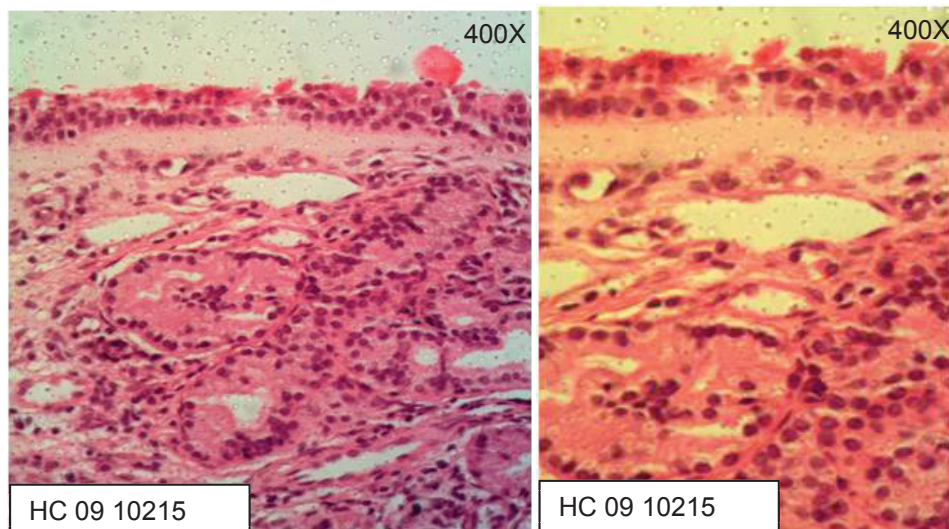


FIGURA 13 – ESTADIAMENTO DA LESÃO EPITELIAL GRAU 2 (EROSÃO DA CAMADA SUPERIOR DE CÉLULAS, CAMADA DE CÉLULAS BASAIS INTACTA) E DO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL GRAU 2 (MEMBRANA BASAL VISÍVEL, ESPESSURA SUPERIOR A 20 $\mu$ m)

FONTE: O autor (2014)

NOTA: COLORAÇÃO HE

#### 4.3.1 LESÃO EPITELIAL

Com o objetivo de avaliar a relação entre o processo inflamatório dos compartimentos da luz da cavidade nasal (lavado nasal) e da mucosa nasal (histopatológico) foi realizada análise comparativa dos resultados obtidos pelo lavado nasal e pelo exame histopatológico da mucosa nasal dos pacientes agrupados pela presença de atopia.

Nas amostras com algum grau de lesão epitelial, foi semelhante a celularidade total recuperada no lavado nasal, de atópicos e não atópicos ( $p = 0,18$ ). Foram excluídos da análise dois casos com contagem total de células superior a  $2.000 \times 10^3$  de células/mL, no grupo dos atópicos (Tabela 9). Também foram semelhantes as contagens diferenciais de eosinófilos e neutrófilos (Gráficos 7 e 8), níveis de albumina e de IL-8. Por outro lado, apenas dois casos dos atópicos não apresentavam lesão epitelial pela análise histopatológica, o que impossibilitou a análise estatística comparativa com este subgrupo de pacientes.

Entre não atópicos sem e com lesão epitelial não houve diferença quanto a celularidade total, diferencial, níveis de albumina e IL-8 (Tabela 9).

O nível de albumina no sobrenadante do lavado nasal foi semelhante nos pacientes com rinite, sejam atópicos ou não atópicos, independente da presença de lesão epitelial. O nível de IL-8 tendeu a ser maior nos não atópicos com presença de lesão epitelial, porém sem significância estatística ( $p = 0,09$ ), tendo sido excluído da análise um caso com dosagem de IL-8  $>1200 \text{ pg/mL}$ , no grupo dos atópicos (Tabela 9).

TABELA 9 - GRAU DE LESÃO EPITELIAL EM RELAÇÃO A CELULARIDADE, NÍVEIS DE ALBUMINA E IL-8 NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

VARIÁVEIS NO LAVADO NASAL	GRAU DE LESÃO EPITELIAL			p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	0	1-3			
	NÃO ATÓPICOS (n = 7)	ATÓPICOS (n = 34)	NÃO ATÓPICOS (n = 13)		
Contagem total de células (x10 <sup>3</sup> )	122,0 (24 a 236)	122,0 (10 a 6134,9)	130,0 (58 a 682)	0,18 ξ	0,26
Eosinófilos(%)	1 (0 a 2)	3 (0 a 66)	2 (0 a 21)	0,17	0,13
Neutrófilos (%)	18 (0 – 45)	35 (0 – 87)	17 (7 – 83)	0,75	0,45
Albumina (µg/mL)	14 (5 a 26)	16 (5 a 338)	21 (5 a 105)	0,50	0,12
IL-8 (pg/mL)	79 (30 a 276)	53 (30 a 1.300)	114 (30 a 604)	0,09 £	0,23

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Mediana (limites); Teste Mann-Whitney

p<sup>1</sup>: Comparação Atópicos *versus* Não Atópicos; com lesão epitelial (1-3)

p<sup>2</sup>: Comparação intragrupo (Não atópicos): Lesão epitelial 0 vs 1 a 3

ξ Exclusão dos casos (atópicos) com contagem total de células >2.000x10<sup>3</sup>

£ Exclusão de um caso (atópicos) com IL-8 >1.200pg/mL

Atópicos sem lesão epitelial totalizaram somente 2 casos

Entre não atópicos com lesão epitelial, foi limítrofe a diferença na contagem absoluta de eosinófilos no lavado nasal, em comparação aos não atópicos sem lesão epitelial (p = 0,05). Não houve diferença na contagem absoluta de neutrófilos, nem na relação eosinófilo/neutrófilo (Tabela 10).

TABELA 10 - GRAU DE LESÃO EPITELIAL EM RELAÇÃO A CONTAGEM DIFERENCIAL ABSOLUTA E RELAÇÃO EOSINÓFILO/NEUTRÓFILO NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

CELULARIDADE NO LAVADO NASAL	GRAU DE LESÃO EPITELIAL			p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	0	1-3			
	NÃO ATÓPICOS (n = 7)	ATÓPICOS (n = 34)	NÃO ATÓPICOS (n = 13)		
Contagem absoluta de eosinófilos (x10 <sup>3</sup> )/mL	0,24 (0 a 2,6)	3,59 (0 a 629,2)	3,3 (0 a 131,0)	0,31	0,05
Contagem absoluta de neutrófilos (x10 <sup>3</sup> )/mL	10,8 (0 a 54)	34 (0 a 4908)	24,8 (4 a 270)	0,75	0,14
Relação eosinófilo/neutrófilo	0,02 (0 a 0,17)	0,08 (0 a 47)	0,07 (0 a 1)	0,47	0,29

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Mediana (limites); Teste Mann-Whitney

p<sup>1</sup>: Comparação Atópicos *versus* Não Atópicos; com lesão epitelial (1-3)

p<sup>2</sup>: Comparação intragrupo (Não atópicos): Lesão epitelial 0 vs 1 a 3

Atópicos sem lesão epitelial totalizaram somente 2 casos

#### 4.3.2 ESPESSAMENTO DE MEMBRANA BASAL

Análise dos casos agrupados pelo critério espessamento da membrana basal não evidenciou diferenças na contagem total de células recuperadas no lavado nasal, ao se comparar atópicos *versus* não atópicos. Também não foi diferente a celularidade total dentro de cada grupo, atópicos e não atópicos, sem ou com espessamento de membrana basal (Tabela 11).

Nos atópicos, sem espessamento da membrana basal, foi limítrofe a diferença entre o percentual de eosinófilos no lavado nasal, quando comparados aos não atópicos ( $p = 0,05$ ). Na presença de espessamento da membrana basal, não houve diferença quanto ao número de eosinófilos no lavado nasal de atópicos e não atópicos ( $p = 0,10$ ), ou seja, independente da atopia, na presença de espessamento da membrana basal, o percentual de eosinófilos foi semelhante no lavado nasal de pacientes com rinite (Tabela 11) (Gráfico 7).

Nos atópicos sem espessamento à análise histopatológica da membrana basal, foi maior o número de neutrófilos no lavado nasal, quando comparados aos não atópicos ( $p = 0,04$ ). Por outro lado, na presença de espessamento da membrana basal, não houve diferença quanto ao número de neutrófilos no lavado nasal de atópicos e não atópicos ( $p = 0,56$ ) (Tabela 11) (Gráfico 8).

À comparação dentro de cada grupo, atópicos ou não atópicos, sem ou com espessamento da membrana basal, entre os atópicos não foi evidenciada diferença na contagem de eosinófilos ( $p = 0,21$ ), nem de neutrófilos ( $p = 0,80$ ) no lavado nasal. Entre os não atópicos, também não houve diferença na contagem de eosinófilos ( $p = 0,58$ ); por outro lado, foi maior a contagem de neutrófilos no lavado nasal ( $p < 0,01$ ), na presença de espessamento da membrana basal (Tabela 11) (Gráficos 7 e 8).

Também pelo critério espessamento de membrana basal, não se evidenciou diferença em relação às determinações de albumina e de IL-8, à comparação entre e dentro de cada grupo.



TABELA 11 - GRAU DE ESPESSAMENTO DE MEMBRANA BASAL EM RELAÇÃO A CELULARIDADE, NÍVEIS DE ALBUMINA E DE IL-8 NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

VARIÁVEIS NO LAVADO NASAL	GRAU DE ESPESSAMENTO DE MEMBRANA BASAL				p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
	0		1-2					
	ATÓPICOS (n = 12)	NÃO ATÓPICOS (n = 9)	ATÓPICOS (n = 24)	NÃO ATÓPICOS (n = 11)				
Contagem total de células (x10 <sup>3</sup> )	193 (10 a 2484,9)	126 (58 a 248)	93 (16 a 6134,9)	130 (24 a 682)	0,46 ξ	0,48 €	0,42	0,70
Eosinófilos (%)	3 (1 a 7)	1 (0 a 4)	4 (0 a 66)	1 (0 a 21)	0,05	0,10	0,21	0,58
Neutrófilos (%)	47,5 (0 a 87)	12 (0 a 23)	35 (1 a 84)	45 (12 a 83)	0,04	0,56	0,80	<0,01
Albumina (µg/mL)	10,5 (6 a 50)	14 (5 a 40)	17,5 (5 a 338)	21 (5 a 105)	0,88	0,73	0,15	0,38
IL-8 (pg/mL)	108 (30 a 571)	99 (30 a 276)	30 (30 a 1.300)	112 (30 a 604)	0,72	0,22 £	0,28	0,58

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Mediana (limites); Teste Mann-Whitney

p<sup>1</sup>: Comparação Atópicos *versus* Não Atópicos; sem espessamento de MB

p<sup>2</sup>: Comparação Atópicos *versus* Não Atópicos; com espessamento de MB (1-2)

p<sup>3</sup>: Comparação intragrupo (Atópicos): Espessamento de MB (0) vs (1-2)

p<sup>4</sup>: Comparação intragrupo (Não Atópicos): Espessamento de MB (0) vs (1-2)

ξ Exclusão dos casos (atópicos) com contagem total de células >2.000x10<sup>3</sup>

€ Exclusão dos casos (atópicos) com contagem total de células >6.000x10<sup>3</sup>

£ Exclusão de um caso (atópicos) com IL-8 >1.200pg/mL

Pela contagem absoluta de eosinófilos no lavado nasal, a diferença encontrada foi maior proporção de eosinófilos nas amostras dos atópicos em relação a não atópicos, sem espessamento de membrana basal ( $p = 0,03$ ) (Tabela 12).

Pela contagem absoluta de neutrófilos no lavado nasal de não atópicos, foi limítrofe a diferença encontrada entre a proporção de neutrófilos nas amostras com em relação as amostras sem espessamento de membrana basal ( $p = 0,05$ ) (Tabela 12).

A relação eosinófilo/neutrófilo não foi diferente nas amostras de lavado nasal de atópicos e não atópicos, agrupados pelo grau de espessamento de membrana basal. Nas amostras de atópicos com espessamento da membrana basal, observou-se uma tendência a maior proporção da relação eosinófilo/neutrófilo, porém sem significância estatística ( $p = 0,06$ ), (Tabela 12).

TABELA 12 - GRAU DE ESPESSAMENTO DE MEMBRANA BASAL EM RELAÇÃO A CONTAGEM DIFERENCIAL ABSOLUTA E RELAÇÃO EOSINÓFILO/NEUTRÓFILO NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

CELULARIDADE NO LAVADO NASAL	ESPESSAMENTO DE MB				p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
	0		1-2					
	ATÓPICOS (n=12)	NÃO ATÓPICOS (n=9)	ATÓPICOS (n=24)	NÃO ATÓPICOS (n=11)				
Contagem absoluta de eosinófilos (x10 <sup>3</sup> )/mL	3,66 (0,7 a 24,8)	1,16 (0 a 5)	3,89 (0 a 629,2)	2,6 (0 a 131)	0,03	0,18	0,72	0,41
Contagem absoluta de neutrófilos (x10 <sup>3</sup> )/mL	149,6 (0 a 2162)	14,6 (0 a 54)	34 (0,78 a 4908)	34,7 (8,58 a 270,6)	0,12	0,49	0,33	0,05
Relação eosinófilo/ neutrófilo	0,07 (0,01 a 0,7)	0,13 (0 a 0,29)	0,12 (0 a 47)	0,02 (0 a 1)	0,8	0,06	0,34	0,36

FONTE: O autor (2014); NOTA: Mediana (limites); Teste Mann-Whitney

p1: Comparação Atópicos *versus* Não Atópicos; sem espessamento de MB

p2: Comparação Atópicos *versus* Não Atópicos; com espessamento de MB (1-2)

p3: Comparação intragrupo (Atópicos): Espessamento de MB (0) vs (1-2)

p4: Comparação intragrupo (Não Atópicos): Espessamento de MB (0) vs (1-2)



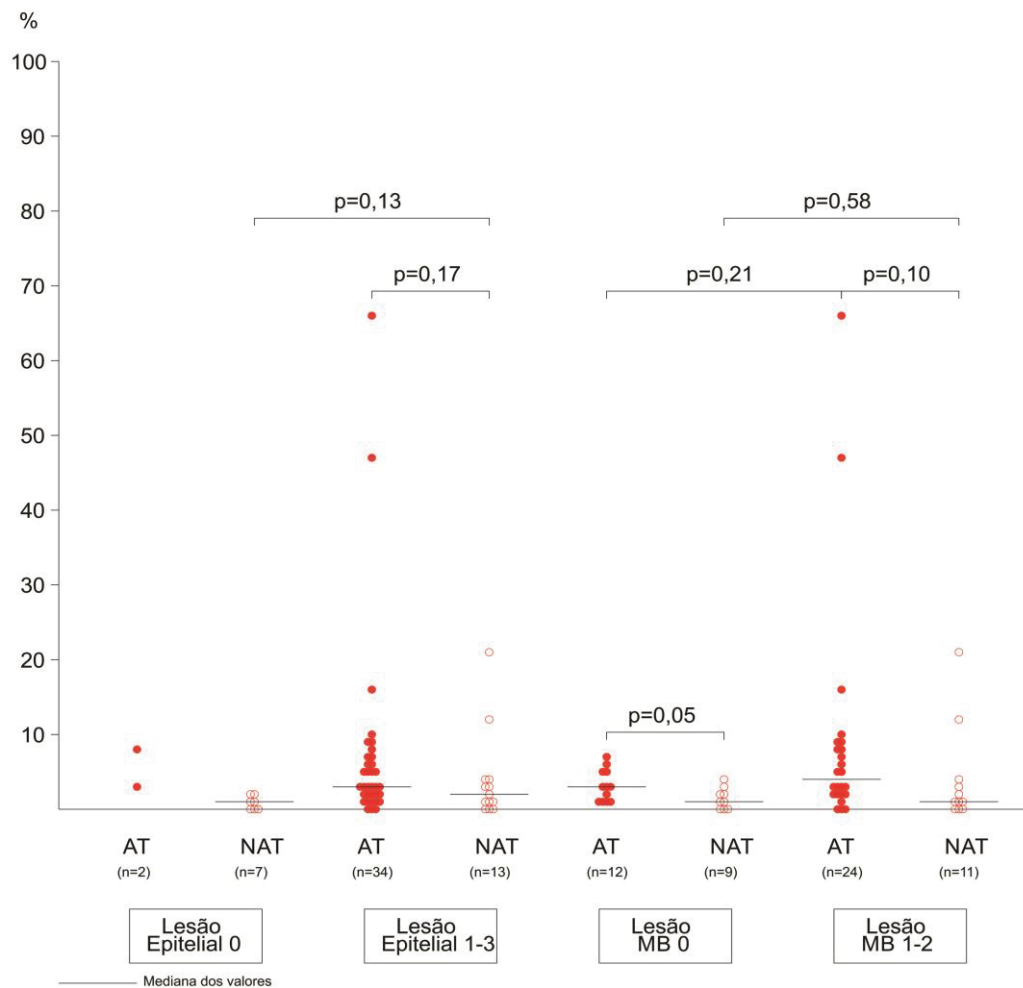


GRÁFICO 7 – EOSINÓFILOS (%) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DE ACORDO COM LESÃO EPITELIAL E ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL

FONTE: O autor (2014)

NOTA: — Mediana dos valores (limites); Teste Mann-Whitney

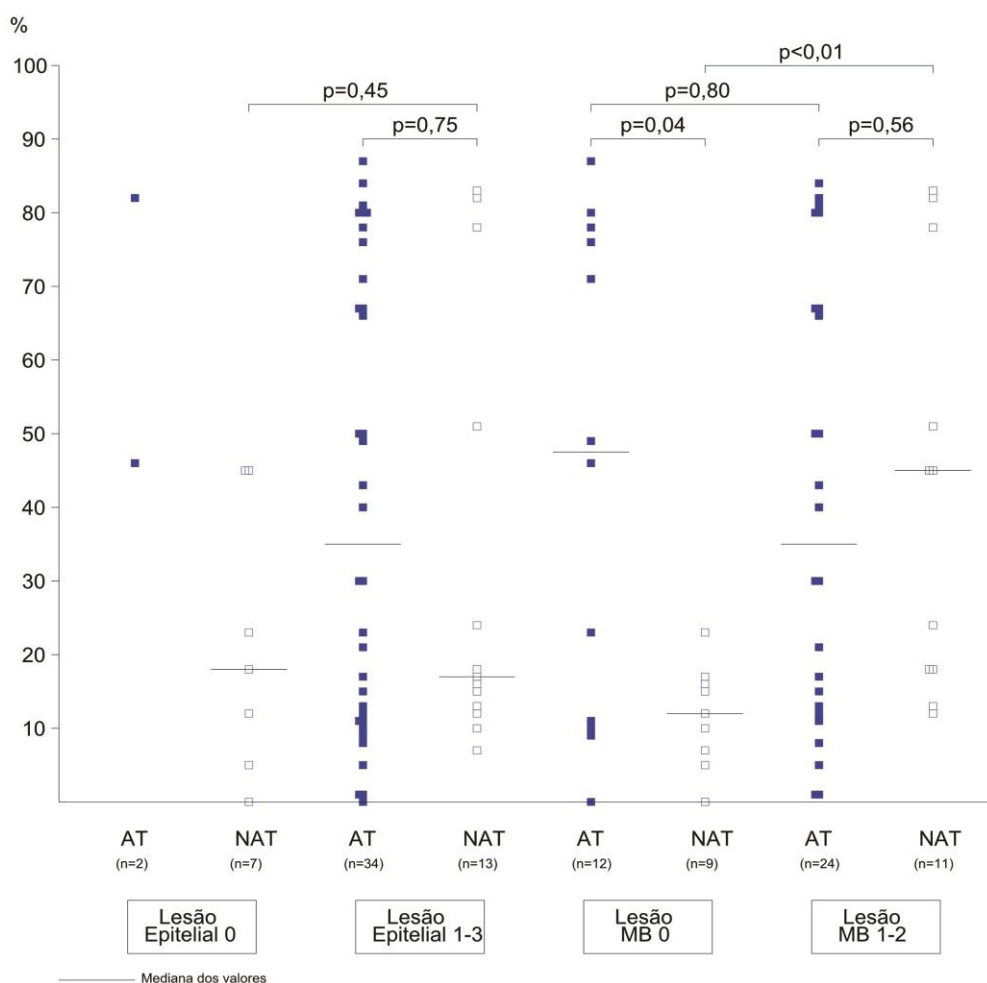


GRÁFICO 8 – NEUTRÓFILOS (%) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DE ACORDO COM LESÃO EPITELIAL E ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL

FONTE: O autor (2014)

NOTA: — Mediana dos valores (limites); Teste Mann-Whitney

A distribuição dos casos categorizados pela mediana da contagem de neutrófilos (23%) e presença de espessamento da membrana basal, não evidenciou diferenças no grupo dos atópicos ( $p = 1,00$ ). Entretanto, nos não atópicos com espessamento de membrana basal, foi maior a proporção de casos com contagem de neutrófilos acima de 23% ( $p = 0,004$ ) (Tabela 13).

TABELA 13 - FREQUÊNCIA DOS CASOS CATEGORIZADOS PELA MEDIANA DA CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS DO LAVADO NASAL EM RELAÇÃO AO GRAU DE ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

GRAU DE ESPESSAMENTO DE MB	ATÓPICOS (n = 36)		p	NÃO ATÓPICOS (n = 20)		
	Contagem de neutrófilos			Contagem de neutrófilos		
	≤ 23	>23		≤ 23	>23	p
0	5	7	1,00	9	0	0,004
1 – 2	10	14		4	7	

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Teste exato de Fisher

O sintoma obstrução nasal de moderada a grave intensidade, níveis 2 a 3 pela pontuação do escore de rinite, foi relatado por 35/56 (62,5%) dos pacientes, na proporção de 25/36 (69,0%) dos atópicos e 10/20 (50,0%) dos não atópicos. Aumento de volume de corneto de grau 2 a 3 à rinoscopia, foi visualizado em 17/35 (48,5%) dos casos, destes 13/17 (76,0%) eram atópicos e 4/17 (24,0%) eram não atópicos. Entre os parâmetros do lavado nasal, neste subgrupo de pacientes, foi maior a contagem diferencial percentual ( $p = 0,03$ ) e absoluta ( $p = 0,02$ ) de eosinófilos no lavado nasal dos atópicos (Tabela 14; Gráfico 9).

Lesão epitelial esteve presente em 25/25 (100,0%) dos atópicos e em 8/10 (80,0%) dos não atópicos, entre os que apresentavam obstrução nasal de moderada a grave intensidade; enquanto que espessamento de membrana basal foi encontrado em 16/25 (64,0%) dos atópicos e em 5 (50,0%) dos não atópicos.

Os procedimentos cirúrgicos realizados nestes pacientes foram turbinectomia (5AT/3NAT), correção de desvio do septo (22AT/9NAT) e ambos os procedimentos (3AT/2NAT).

TABELA 14 – CELULARIDADE E NÍVEIS DE ALBUMINA E DE IL-8 NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS COM OBSTRUÇÃO NASAL DE MODERADA A GRAVE INTENSIDADE(†)

LAVADO NASAL	ATÓPICOS (n = 25)	NÃO ATÓPICOS (n = 10)	p
Número total de células no LN	120x10 <sup>3</sup> (10 – 6135)	98x10 <sup>3</sup> (58 – 682)	0,91
Eosinófilos (%)	3 (0 – 47)	1,5 (0 – 12)	0,03
Neutrófilos (%)	40 (0 – 87)	14 (5 – 78)	0,3
Contagem absoluta de eosinófilos (x10 <sup>3</sup> )/mL	3,4 (0 – 122,6)	0,87 (0 – 10,08)	0,02
Contagem absoluta de neutrófilos (x10 <sup>3</sup> )/mL	34,4 (0 – 4908)	11,76 (4,06 – 262,08)	0,71
Albumina (µg/mL)	18 (5 – 166)	20 (5 – 105)	0,84
IL-8 (pg/mL)	76 (30 – 1300)	115,5 (30 – 604)	0,14

FONTE: O autor (2014)

NOTA: †Pontuação de sintoma obstrução nasal: 2-3

Mediana (limites); Teste Mann-Whitney

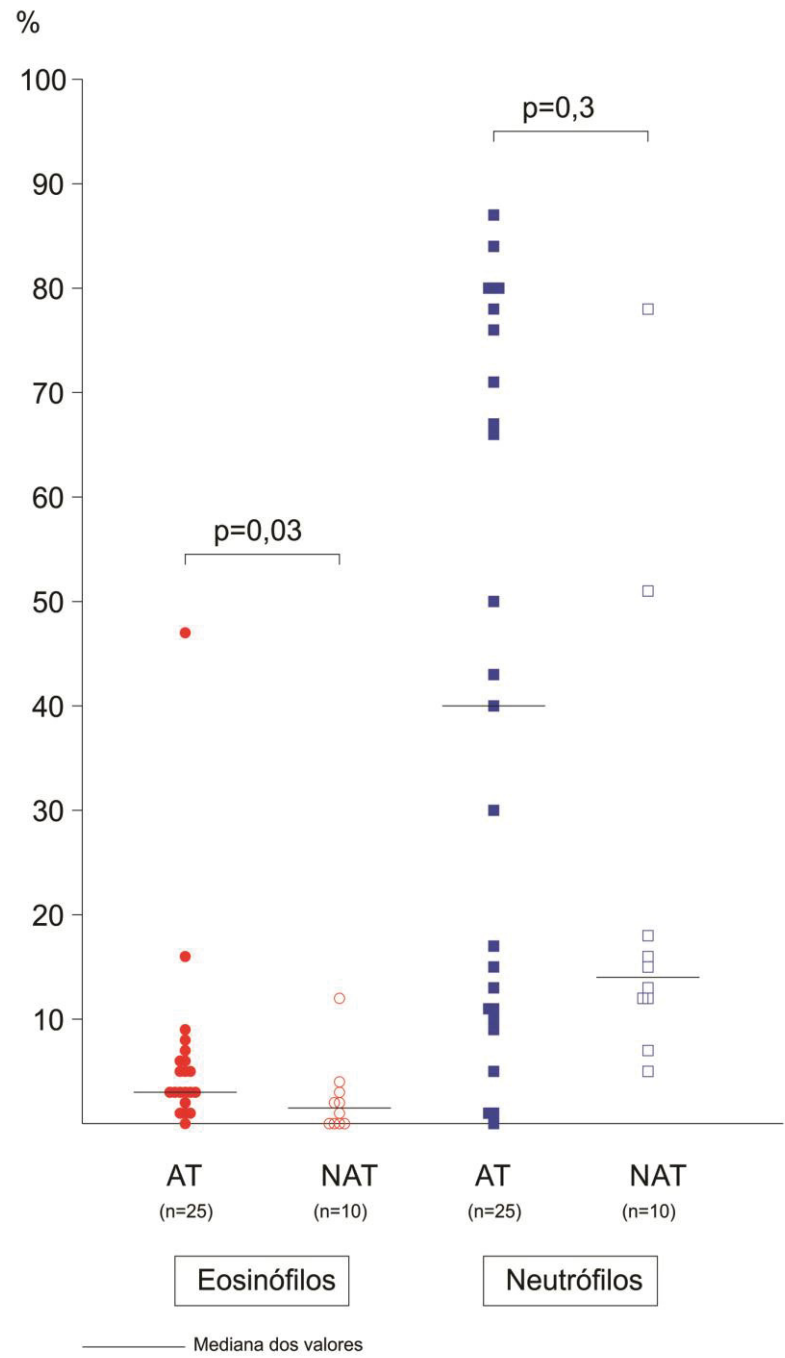


GRÁFICO 9 – NÚMERO DE EOSINÓFILOS E NEUTRÓFILOS (%) NO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS COM ESCORE DE OBSTRUÇÃO NASAL DE MODERADA A GRAVE INTENSIDADE

FONTE: O autor (2014)

NOTA: — Mediana dos valores (limites); Teste Mann-Whitney

## 5 DISCUSSÃO

Rinite é consequência de processo inflamatório da mucosa nasal que pode ser causado por mecanismos alérgicos e não alérgicos, está associada ao acúmulo de células inflamatórias na luz da cavidade nasal e a alterações estruturais na mucosa nasal, sendo importante quantificar a extensão e grau de lesão epitelial, bem como a relação com diferentes tipos celulares na mucosa nasal, nas diferentes formas de rinite.

Nesta casuística o diagnóstico de rinite foi feito pelos sintomas e sinais de rinite à rinoscopia, graduados por escore clínico adaptado (MELTZER, 1988; MELTZER *et al.*, 2006), aliado ao resultado do teste cutâneo alérgico para definir presença de atopia.

O teste cutâneo alérgico complementa a história clínica e o exame físico, auxilia na investigação de sensibilização a alérgenos específicos em pacientes com sintomas de rinite, sendo importante o emprego dos aeroalérgenos regionais mais comuns e relevantes.

Pacientes atópicos de Curitiba estão expostos principalmente ao *Dermatophagoides pteronyssinus* (SOUZA, 2013). Os principais ácaros encontrados em amostras de poeira domiciliar em Curitiba são o *Dermatophagoides pteronyssinus* (65%) e *Blomia tropicalis* (30%) (ROSÁRIO; BAGGIO; SUZUKI, 1992; DUTRA; ROSÁRIO; ZAVADNIAK, 2001). Em estudo epidemiológico regional a positividade ao teste cutâneo por puntura a alérgenos do pólen *Lolium multiflorum*, foi de 4,7% em escolares e de 15,4% em adultos (ESTEVES *et al.*, 1999). Também em crianças de Curitiba a positividade, pelo teste cutâneo por puntura, ao extrato de pólen de *Lolium perenne*, foi de 16,5% (ROSÁRIO, 2002). Crianças com conjuntivite alérgica apresentam sensibilização aos ácaros da poeira *D. pteronyssinus* (71,4%) e *B. tropicalis* (70,9%), seguidos por alérgenos de baratas, como *Blattella germanica* (30,6%), de polens *Lolium perenne* (19,1%), alérgenos de animais como cão (20,6%) e gato (16,7%) (CHONG NETO *et al.*, 2010).

Considerando-se os aeroalérgenos regionais mais relevantes, neste estudo foram empregados para teste cutâneo alérgico, extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus* e de *Lolium perenne*, por se tratarem de pacientes predominantemente adultos. Os atópicos apresentaram sensibilização principalmente ao *D. pteronyssinus*

(97%). Entre os que apresentaram sensibilização ao *L. perenne* (50%), apenas um paciente era sensibilizado exclusivamente ao pólen.

A pontuação total do escore de rinite foi maior entre os pacientes atópicos; também nestes pacientes foram mais frequentes os sintomas prurido e espirros, de moderada a grave intensidade. Entre os 6 pacientes sensibilizados ao pólen, cuja avaliação no estudo coincidiu com o período de estação polínica, todos também sensibilizados ao *D. pteronyssinus*, a pontuação do escore de rinite não foi diferente em relação aos demais atópicos.

Palidez mucosa, aumento de volume ou hiperemia de cornetos nasais, são os achados à rinoscopia de pacientes com rinite, causados por inflamação alérgica ou não alérgica; resultam em hipertrofia de cornetos inferiores, secundária ao espessamento anormal da mucosa dos cornetos. Também pode ser secundária à hipertrofia vicariante do corneto nasal inferior, na presença de desvio de septo contra lateral. À rinoscopia anterior, a mucosa dos cornetos inferiores apresenta aspecto empalidecido, por vezes violáceo. Nestes processos crônicos há acentuada proliferação do tecido conjuntivo do córion, hipertrofia glandular e metaplasia epitelial (ANSELMO-LIMA, 1988; MELTZER *et al.*, 2012).

Inflamação é certamente o principal fator causal de sintomas nasais crônicos. Entretanto, outras causas não inflamatórias possíveis, incluem disfunção da vascularização ou da inervação, além das alterações anatômicas (JANKOWSKI *et al.*, 2000). Desvio da porção anterior do septo e hipertrofia da porção anterior de cornetos inferiores, são as principais alterações anatômicas que também resultam no sintoma obstrução nasal.

Estima-se que em pacientes com obstrução nasal, o desvio de septo seja clinicamente significativo em 26% dos casos e em 20% dos casos a hipertrofia de cornetos é a causa da obstrução nasal crônica (CAVALIERE; MOTTOLA; IEMMA 2005; WALLACE *et al.*, 2008).

Obstrução nasal é um dos sintomas mais comuns e incômodos em rinite alérgica (MELTZER *et al.*, 2012), avaliada subjetivamente pela percepção da passagem de ar pelo nariz, foi um sintoma importante no grupo estudado.

Nesta casuística obstrução nasal foi sintoma frequente, em ambos os grupos de pacientes com rinite, sejam alérgicos ou não alérgicos. Porém, os pacientes foram selecionados no ambulatório de Otorrinolaringologia, pela indicação cirúrgica de correção de desvio de septo e/ou turbinectomia por hipertrofia de cornetos; mesmo

assim, entre os atópicos, foi frequente o sintoma obstrução nasal, de moderada a grave intensidade.

Aumento do número de eosinófilos nasais é o parâmetro que apresenta melhor correlação com o sintoma obstrução nasal, em pacientes com rinite alérgica persistente (CIPRANDI, 2005).

A rinite alérgica está significativamente associada ao aumento do número de eosinófilos da mucosa e obstrução nasal. Foi descrita associação com obstrução nasal não reversível, inflamação crônica e remodelamento estrutural da mucosa nasal, em crianças a partir dos 6 anos de idade (CHAWES, 2011). Em crianças asmáticas, inflamação eosinofílica e remodelamento da via aérea, pode preceder o diagnóstico de asma (CHAWES; KREINER-MØLLER; BISGAARD, 2009; SAGLANI *et al.*, 2007).

Nos casos em estudo, com obstrução nasal de moderada a grave intensidade, presente em 69% dos atópicos e em 50% dos não atópicos, foi maior a proporção de eosinófilos no lavado nasal, no grupo dos atópicos.

Mucosa nasal e brônquica, apresentam semelhanças estruturais, sendo que rinite e asma são comorbidades frequentes (BOUSQUET *et al.*, 2001), independente da presença de atopia (LEYNAERT *et al.*, 2000).

Lesão epitelial brônquica em asmáticos está bem estudada e estabelecida (LAITINEN *et al.*, 1985; AMIN *et al.*, 2000). Extensão de lesão epitelial nas diferentes formas de rinite e correlação com células e mediadores inflamatórios ainda não está de todo esclarecida (AMIN *et al.*, 2001).

Exsudação pode ser definida como passagem de proteínas plasmáticas e/ou leucócitos para superfície da mucosa nasal (HOWARTH *et al.*, 2005), está relacionada à alteração do endotélio da microcirculação da via aérea, tanto na rinite quanto na asma (SVENSSON *et al.*, 1995). Albumina também pode ser proveniente da secreção glandular (RAPHAEL *et al.*, 1988).

As células recuperadas pelo lavado nasal são provenientes da descamação epitelial e pelo aumento da permeabilidade vascular e do epitélio, o que permite a passagem de proteínas plasmáticas e células inflamatórias para luz da cavidade nasal (HOWARTH *et al.*, 2005).

Os mecanismos envolvidos são quimiotaxia, recrutamento seletivo e migração transendotelial de células, ativação e diferenciação de vários tipos celulares, além de prolongamento da sobrevivência das mesmas, liberação de mediadores pelas células ativadas, regulação da síntese local e sistêmica de IgE (BOUSQUET *et al.*, 2001;



BESANCON-WATELET *et al.*, 2002; II CONSENSO BRASILEIRO SOBRE RINITES, 2006).

A avaliação do processo inflamatório da mucosa nasal pelo lavado e citologia nasal, permite verificar o tipo de infiltrado celular e de mediadores (BOUSQUET *et al.*, 2001), sendo a coleta de amostra da secreção nasal mais representativa, quando feita de ambas as narinas, razão pela qual foram coletadas amostras de ambas no presente estudo.

A infiltração de eosinófilos torna-se mais evidente e significativa em amostras obtidas após provocação nasal com alérgenos, quando comparadas a amostras de pacientes com rinite alérgica persistente sem provocação, nestes últimos a exposição aos antígenos ocorre de forma mais difusa, prolongada e numa dose menor do que ocorre numa provocação nasal com alérgeno, podendo representar um estágio diferente do processo inflamatório da mucosa nasal (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995).

O afluxo de eosinófilos inicia 1 hora após provocação nasal com alérgeno, atingindo pico máximo após 7 a 11 horas (BASCOM *et al.*, 1988). A contagem de neutrófilos aumenta na fase inicial e à resolução da fase tardia da reação alérgica (PELIKAN; PELIKAN-FILİPEK, 1989), atingindo máximo por volta da décima hora após provocação com alérgeno. A cinética do afluxo de células inflamatórias após provocação com alérgenos mostrou que há grande diferença entre a resposta dos pacientes estudados, desta forma o erro padrão é amplo (BASCOM *et al.*, 1988).

Nesta casuística, atópicos apresentaram maior proporção de eosinófilos à contagem diferencial de células nas amostras de lavado nasal, mesmo entre os pacientes com menor pontuação de escore de sintomas prurido e espirros.

As demais células contadas, como as células epiteliais, neutrófilos e mononucleares, apresentaram proporções semelhantes. A mediana do número de neutrófilos foi maior entre os atópicos que em não atópicos, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Neutrófilos estão presentes na secreção nasal de 79% de escolares assintomáticos (MALMBERG, 1979). Pacientes pediátricos com rinite alérgica, associada ou não à asma brônquica, apresentaram semelhante proporção de neutrófilos no lavado nasal, respectivamente 16% e 21%, quando comparados a controles sadios (57%) (KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001).

Estudos por provocação nasal com alérgenos evidenciam afluxo de eosinófilos, nas fases imediata e tardia da reação alérgica, porém há divergência quanto ao ponto de corte do número de eosinófilos considerado elevado nas amostras de secreção nasal. A dificuldade na comparação entre os resultados dos estudos se deve aos diferentes métodos de coleta de material, os quais incluem esfregaço, raspado, secreção assoada e diferentes técnicas de lavado nasal; bem como diversos métodos de coloração e diferenças nos critérios para quantificação do número de eosinófilos nasais (HOWARTH *et al.*, 2005; CHAWES, 2011; NAIR; GOODWIN; HARGREAVE, 2011). Conforme a técnica de coleta, somente é possível a avaliação da contagem diferencial, sem quantificação total do infiltrado celular.

No Quadro 1 estão sumarizados os resultados de vários estudos, com diferentes técnicas de avaliação da celularidade nasal, com intuito de comparar o número de eosinófilos, nas amostras de secreção, lavado ou raspado nasal de atópicos e grupos controle. Alguns estudos também empregaram provocação nasal com alérgenos.

A forma de coleta da secreção nasal pode interferir na celularidade recuperada; portanto, a coleta feita por manobra de assoar o nariz, contém menos células quando comparada à coleta por escova, porém ainda assim ambas são adequadas para determinação da proporção de eosinófilos e de neutrófilos (JEAN *et al.*, 1996).

Entretanto, a amostra é mais representativa quando avaliada pela citologia quantitativa do lavado nasal, pois permite determinação da infiltração celular total e diferencial (BASCOM *et al.*, 1988; CRUZ *et al.*, 1993).

Nos casos aqui estudados, a celularidade total recuperada não foi diferente entre os pacientes com rinite categorizados pela presença de atopia.

Em estudo anterior a celularidade total recuperada foi maior em pacientes com rinite alérgica associada à asma (KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001). Tratava-se de pacientes pediátricos em acompanhamento ambulatorial pelos sintomas alérgicos, o que resultou em maior extensão da reação inflamatória e descamação epitelial da mucosa respiratória, quando associada à presença de asma. No presente estudo, apenas dois pacientes tinham antecedente de asma, ambos eram atópicos e com índices elevados de pontuação de escore de rinite (Apêndice 5).

Nas amostras por raspado da mucosa do corneto nasal, o critério número de eosinófilos pode variar de 5 a 25 eosinófilos por campo (SCADDING, 2001). Entre os

estudos sumarizados no quadro 1, nas avaliações feitas por diferentes métodos e sem provocação nasal, a contagem de eosinófilos nasais variou de 2% a 45%.

A celularidade presente em amostras de lavado nasal de pacientes com rinite é semelhante à encontrada em amostras de lavado brônquico de asmáticos, desta forma o lavado nasal poderia ser usado para o estudo de células e processo inflamatório da via aérea (PRAT *et al.*, 1993).

Por outro lado, em pacientes adultos com rinosinusite crônica, submetidos a lavado de meato médio e broncoalveolar, observou-se predomínio de eosinófilos nas amostras do lavado do meato médio de asmáticos ( $7,3 \pm 3,8\%$ ), maior que nas amostras do grupo não asmático ( $2,35 \pm 7,0\%$ ). Também foi maior a contagem de eosinófilos, obtida nas amostras de lavado broncoalveolar de asmáticos ( $2,3 \pm 3,3\%$ ), em relação a não asmáticos ( $0,22 \pm 0,5\%$ ). Entretanto, não houve correlação entre a contagem diferencial de células do lavado de meato médio e brônquico (RAGAB; CLEMENT; VINCKEN, 2005).

Em amostras de escarro induzido por salina hipertônica de asmáticos fora de crise, a mediana de eosinófilos foi de 5,2%, maior que no grupo controle (0,5%). As proporções de neutrófilos (46,9% *versus* 24,1%) e de albumina (704 *versus* 288mcg/mL) não foram diferentes à comparação de asmáticos em relação a grupo controle (PIZZICHINI *et al.*, 1996).

Em pacientes adultos com asma leve, foi semelhante a contagem de eosinófilos em amostras de escarro induzido (1%) e lavado broncoalveolar (0,3%) (PIZZICHINI *et al.*, 1998).

Pelo lavado broncoalveolar a mediana da contagem de eosinófilos foi maior em adultos asmáticos (1,8% [0–23]) em relação ao grupo controle (0,6% [0–6,4]) (WARD *et al.*, 2002). Pacientes pediátricos com asma grave, também a mediana de eosinófilos (2,7% [1-7,7]) foi significativamente maior em comparação a grupo controle (0% [0-0,9]); embora tenha sido ampla a variação entre os pacientes asmáticos (BOSSLEY *et al.*, 2012).

Em amostras pela citologia quantitativa do lavado nasal, o ponto de corte de 5% de eosinófilos, resultou em acurácia de 82% (sensibilidade 80% e especificidade 83%) no diagnóstico de rinite alérgica perene (CRUZ *et al.*, 1993).

À investigação da acurácia da contagem de eosinófilos no fluido nasal de pacientes adultos, na diferenciação entre rinite alérgica e não alérgica, pela análise da curva ROC e área sob a curva (AUC), a mediana da contagem de eosinófilos

encontrada na rinite alérgica foi de 6% e na rinite não alérgica foi de 2%, sendo que o melhor ponto de corte estabelecido para distinção dos casos foi a contagem de eosinófilos maior que 3%, com AUC igual a 0,75. Entre os pacientes com rinite alérgica com sintomas de leve intensidade, a mediana de eosinófilos foi de 3% e nos com sintomas graves foi de 7%, tendo sido estabelecido o melhor ponto de corte como 4%, com AUC igual a 0,9 (DI LORENZO *et al.*, 2009).

No presente estudo a mediana da contagem de eosinófilos do lavado nasal dos atópicos foi de 3% e dos não atópicos 1%. No modelo de regressão logística univariada destes casos, o ponto de corte 4% de eosinófilos, tem uma probabilidade de 80% de estar associado à atopia, aumentando para 100% com contagem de 10% de eosinófilos, atingindo um platô a partir deste valor. O ponto de corte apontado com maiores índices de sensibilidade e especificidade foi de 4% de eosinófilos no lavado nasal, que diferencia rinite alérgica de não alérgica. Neste critério a sensibilidade foi baixa, porém a especificidade foi alta.

Em estudo anteriormente realizado com pacientes pediátricos, a mediana de eosinófilos no lavado nasal, foi de 45% entre atópicos com asma e rinite, enquanto nos que apresentavam apenas rinite a mediana foi de 36% (KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001). As diferenças encontradas nestes dois estudos podem refletir os critérios de inclusão dos pacientes, pois no estudo anterior foram selecionados pacientes cuja queixa principal era de rinite alérgica e/ou asma, enquanto que no presente estudo foram selecionados os casos no ambulatório de otorrinolaringologia, pela indicação cirúrgica de septoplastia e/ou turbinectomia, entre os quais a queixa de rinite era secundária.

Muitos estudos correlacionam aumento do número de eosinófilos nasais e rinite alérgica (CIPRANDI, 2005). A presença de eosinófilos na secreção nasal mostrou 71% de correlação com teste cutâneo alérgico e de 69% com teste de provocação nasal (ROMERO; SCADDING, 1992). Adicionalmente, a contagem de eosinófilos se correlacionou à gravidade de rinite alérgica perene em crianças (CHEN *et al.*, 2006).

Por outro lado, os testes cutâneos alérgicos podem ser negativos em cerca de 5% dos pacientes com história sugestiva de alergia, porém com presença de eosinófilos na secreção nasal e provocação nasal positiva, também com descrição da presença de IgE específica em amostras de secreção nasal (ROMERO; SCADDING, 1992; RONDÓN *et al.*, 2007).

Nos últimos anos crescem as evidências que em mais de 40% dos pacientes previamente diagnosticados como portadores de rinite não alérgica ou idiopática, possam na verdade desenvolver uma reação localizada na mucosa nasal, na ausência de atopia sistêmica, com produção local de IgE específica e resposta positiva à provocação nasal com alérgenos, recebendo designação pelos termos entopia ou rinite alérgica local (POWE *et al.*, 2003; RONDÓN *et al.*, 2007; RONDÓN; CANTO; BLANCA, 2010).

No presente estudo, três pacientes apresentaram contagem de eosinófilos superior a 20%, 2 atópicos e 1 não atópico. A pontuação do escore de rinite foi maior entre os atópicos, em relação ao paciente não atópico. Todos os 3 pacientes apresentaram lesão epitelial e espessamento de membrana basal, pela análise histopatológica.

A albumina é uma proteína sérica que corresponde entre 10 a 20% do conteúdo proteico das secreções nasais. Exsudação de proteínas plasmáticas, como a albumina, é uma característica do processo inflamatório da mucosa nasal e é um indicador de permeabilidade vascular (RAPHAEL *et al.*, 1988; RAPHAEL *et al.*, 1989; QUIRCE *et al.*, 2010).

O nível de albumina em amostras de lavado nasal é maior em pacientes com rinite alérgica quando comparado a grupo controle, o que pode estar relacionado a aumento da permeabilidade vascular e exsudação transepitelial, esta última consiste na difusão passiva a partir do fluido intersticial para o fluido que reveste o epitélio nasal (RAPHAEL *et al.*, 1989; BARANIUK *et al.*, 2005).

A concentração de albumina se eleva após provocação nasal com alérgeno, triplicando o nível após 20 minutos da provocação, em até 45% (pico: 100µg/mL) em relação ao basal, no lado homólogo à provocação, resultado do aumento da permeabilidade vascular (RAPHAEL *et al.*, 1991).

Em amostras de lavado nasal de pacientes com rinite, foi maior a proporção de albumina em relação ao conteúdo proteico total, em comparação a grupo controle, além de estar relacionada ao número de eosinófilos (PRAT *et al.*, 1993). Também foi descrita associação entre albumina, número de eosinófilos e concentração de proteína catiônica eosinofílica em amostras de lavado nasal de pacientes com rinite alérgica associada à asma, em especial no subgrupo com extenso comprometimento da mucosa paranasal à tomografia computadorizada dos seios da face (KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001).

Nas amostras do lavado nasal desta casuística, atópicos e não atópicos apresentaram níveis semelhantes de mediana de albumina. Apesar da maior amplitude dos níveis de albumina nos atópicos, que poderia refletir maior permeabilidade vascular, não foi evidenciada diferença significativa nas amostras estudadas.

Neste estudo não houve correlação entre a concentração de albumina e o percentual de eosinófilos do lavado nasal, em ambos os grupos de pacientes com rinite. Tal associação está mais frequentemente descrita em estudos por provocação nasal com alérgenos, onde o aumento da permeabilidade vascular e o afluxo de células inflamatórias é significativamente maior (RAPHAEL *et al.*, 1991; BRAUNSTAHL *et al.*, 2001).

Provocação nasal com alérgenos resulta em elevação de citocinas e de linfocinas. Em revisão sistemática de estudos em atópicos, relacionados à expressão de citocinas em amostras de fluidos após provocação com alérgenos; não houve aumento de citocinas na primeira hora, tendo sido evidenciado aumento da expressão de IL-8 entre 4-12 horas e de IL-4, IL-5 entre 18 a 24 horas. Não foi evidenciado aumento da expressão de IFN- $\gamma$  nas amostras de fluidos, bem como sua expressão em amostras de biópsia (FERREIRA, 2003).

Em indivíduos sensibilizados, há liberação de IL-8 nas fases imediata e tardia de provocação com alérgeno, seguida de aumento do número de neutrófilos no lavado nasal. Interleucina-8 pode ser regularmente encontrada na secreção nasal de indivíduos normais e sua expressão está fortemente aumentada durante infecções virais (GOSSET *et al.*, 1997; ROSELER *et al.*, 1995).

Nesta casuística, foram indetectáveis os níveis de IL-4, IL-5 e de IFN- $\gamma$ , o que pode estar relacionado tanto às baixas concentrações, quanto ao fato da coleta ter sido feita sem provação nasal com alérgenos. Foi semelhante a mediana da IL-8 no lavado nasal de atópicos e não atópicos. Porém, foi amplo o limite de distribuição das determinações de IL-8, o que pode ter encoberto eventuais diferenças entre os grupos.

A desvantagem da técnica do lavado nasal é o fato das células recuperadas serem provenientes somente da luz da cavidade nasal e não necessariamente refletir o processo inflamatório tissular epitelial (QUIRCE *et al.*, 2010).

A mucosa nasal pela facilidade de obtenção de amostra, seja por raspado ou biópsia da mucosa do corneto, permite o estudo das alterações celulares durante a reação alérgica, à exposição natural ou após provocação nasal com alérgenos.

A proposta da presente avaliação foi analisar e comparar simultaneamente a reação inflamatória da luz (lavado nasal) e da mucosa nasal (biópsia ou cirurgia de corneto inferior), em pacientes com sintomas de rinite, com indicação de septoplastia e/ou turbinectomia, agrupados quanto a presença de atopia.

As amostras tissulares foram categorizadas pelo grau de lesão epitelial e pela presença de espessamento da membrana basal, para análise comparativa das alterações histopatológicas encontradas em relação aos achados do lavado nasal, ou seja, se o grau de lesão tissular estava ou não associado ao processo inflamatório da luz cavidade nasal.

Infiltração eosinofílica é a principal causa de lesão epitelial, está associada à perda da integridade epitelial em pacientes com rinite alérgica ou não alérgica (DJUKANOVIC *et al.*, 1990; CIPRANDI *et al.*, 1995; WATANABE; KIUNA, 1998; AMIN *et al.*, 2001; SALIB; HOWARTH, 2003).

Por outro lado, alguns estudos não evidenciaram alterações estruturais na mucosa nasal de pacientes alérgicos, mesmo após provocação nasal com alérgenos, tendo sido descrito que o epitélio pode permanecer íntegro, sem descamação e/ou espessamento, apesar da presença de células inflamatórias e do fluxo de eosinófilos (VARNEY *et al.*, 1992; LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995; BRAUNSTAHL *et al.*, 2003). Entretanto, o critério de anormalidade empregado se baseou na presença de ruptura epitelial, semelhante a que ocorre em asma, o que não é apropriado, pois na asma a lesão epitelial está relacionada à compressão do epitélio pela broncoconstrição. Porém, muitas alterações somente serão evidenciadas em exposições mais prolongadas ou à análise por microscopia eletrônica ou imunohistoquímica (SALIB; HOWARTH, 2003).

Fatores que podem contribuir para variabilidade dos resultados dos estudos incluem critérios usados na seleção de pacientes, métodos empregados na coleta, análise, coloração e/ou uso de marcadores de ativação por imunohistoquímica no processamento das amostras (SALIB; HOWARTH, 2003).

Avaliação da lesão epitelial por microscopia eletrônica evidenciou perda das junções firmes “*torn tight*” das células epiteliais, com aumento do espaço intercelular, porém ruptura e descamação epitelial foram infrequentes (ISHII *et al.*, 2000).



Avaliação por imunohistoquímica de amostras de corneto inferior evidenciou predomínio de eosinófilos e de mastócitos, em pacientes com rinite alérgica persistente de moderada a grave intensidade, quando comparados a pacientes com sintomas intermitentes (LIU *et al.*, 2010).

O infiltrado mononuclear na submucosa apresenta com maior frequência, alterações qualitativas do que quantitativas, ao se comparar pacientes em relação à presença de atopia. Para tanto, se faz necessário o emprego de técnicas de imunohistoquímica, as quais permitem a determinação de tipos celulares por marcadores de ativação de superfície (IGARASHI *et al.*, 1995).

Porém, nos ensaios por imunohistoquímica é necessário o congelamento da amostra, devido a perda de antigenicidade dos marcadores de superfície nas técnicas usualmente empregadas de fixação por formalina.

No presente estudo, a análise histopatológica foi realizada com técnicas de coloração que fazem parte da rotina do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas – UFPR, por este motivo não foi feita avaliação por imunohistoquímica ou qualitativa do infiltrado inflamatório seja na mucosa ou submucosa.

Em amostras de biópsias da mucosa de seios paranasais de pacientes alérgicos e não alérgicos com rinossinusite crônica, com ou sem asma associada, foi semelhante a infiltração de eosinófilos na mucosa, grau de lesão epitelial e espessamento da membrana basal, alterações análogas às descritas em asma. A infiltração de eosinófilos foi heterogênea numa mesma amostra de tecido, mesmo com cortes feitos com apenas 1mm de distância; nestes casos, para evitar resultado falso negativo, faz-se necessário avaliar vários sítios de uma mesma amostra (PONIKAU *et al.*, 2003).

A dificuldade na avaliação da presença de espessamento epitelial por microscopia ótica está relacionada à falsa interpretação de espessamento, conforme a tangência do corte (SALIB; HOWARTH, 2003).

Neste estudo, foram analisados os campos em que orientação do corte era adequada, pela avaliação da imagem e posicionamento do núcleo das células. Também para contornar as alterações decorrentes do trauma cirúrgico, foram avaliadas as áreas de epitélio preferentemente recobertas com muco, evitando os campos com presença de hemácias extravasadas, bem como áreas com evidências de desprendimento iatrogênico do epitélio, desproporcionais a reação inflamatória subjacente.



A maior proporção do revestimento mucoso nasal é por epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, com células caliciformes, entretanto à análise da porção anterior da concha inferior, o epitélio pode ter padrão pseudoestratificado cilíndrico não ciliado, estratificado cubóide e epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (DOLCI, 1994; AUGUSTO *et al.*, 1999).

A exposição a fatores externos resulta em alterações adaptativas da mucosa, o que do ponto de vista histológico resulta em metaplasia ou alteração na distribuição e quantidade de células ciliadas, com substituição por epitélio mais adaptado às circunstâncias locais (AUGUSTO *et al.*, 1999; SALIB; HOWARTH, 2003; BANDOS *et al.*, 2006).

Em pacientes com rinite alérgica persistente, pela exposição mais prolongada a alérgenos, há descrição de espessamento do epitélio, variações no tipo do epitélio até a mudança para epitélio escamoso estratificado (AUGUSTO *et al.*, 1999; BANDOS *et al.*, 2006).

Na maioria das amostras deste estudo, o epitélio encontrado foi do tipo pseudoestratificado colunar ciliado. Em algumas amostras foi observada a presença em algumas áreas de epitélio displásico, transicional para escamoso não queratinizado. O infiltrado no córion/lâmina própria foi predominantemente mononuclear, linfoplasmocitário.

Em pacientes alérgicos a ácaros da poeira, lesão epitelial foi evidenciada na mucosa nasal anterior, onde prevalecem células não ciliadas, quando comparada à mucosa nasal posterior, que contém células ciliadas e células caliciformes (AUGUSTO *et al.*, 1999). Lesão epitelial foi caracterizada pela presença de edema intercelular, descamação epitelial e agrupamentos de eosinófilos (WATANABE; KIUNA, 1998).

Alérgenos provenientes de ácaros da poeira apresentam ação proteolítica enzimática, desta forma podem diretamente ativar células (BOUSQUET *et al.*, 2001). Além disso, o alérgeno Der p 1 é capaz de romper as junções firmes das células epiteliais, o que potencializa a degradação da barreira epitelial, com consequente aumento da permeabilidade da mucosa respiratória e também favorece a sensibilização e resposta alérgica (WAN *et al.*, 1999; WAN *et al.*, 2000). Várias proteases cisteínicas mimetizam adjuvantes de células T “*helper*” 2 e causam a

liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de efeito sinérgico na síntese de IgE (CHAPMAN; WÜNSCHMANN; POMÉS, 2007).

Sensibilização ao ácaro *D. pteronyssinus*, foi predominante entre os atópicos deste estudo, o que pode ter contribuído para maior frequência de lesão epitelial, presente em 94% dos atópicos, em relação a 65% dos não atópicos.

Em relação a presença de espessamento da membrana basal, não houve diferença na frequência de distribuição dos casos ao se comparar atópicos e não atópicos, respectivamente presente em 67% e 55% dos casos. Nos atópicos a chance de apresentar algum grau de espessamento de membrana basal foi 1,2 vezes maior que nos não atópicos, entretanto sem relevância do ponto de vista estatístico.

Embora o pequeno tamanho da amostra não tenha permitido a análise estatística, no subgrupo de pacientes submetidos à turbinectomia, tanto a presença de algum grau de lesão epitelial quanto de espessamento da membrana basal, foram mais frequentes entre os atópicos, o que pode estar relacionado a maior extensão de lesão mucosa entre os atópicos.

Pelos achados de Lim *et al.*, secreção nasal e mucosa nasal representam compartimentos distintos, com diferentes populações de leucócitos. Após provocação com alérgenos houve predomínio de neutrófilos em amostras da secreção nasal, enquanto que mononucleares predominaram na mucosa nasal. No lado homólogo à provocação nasal houve significativa infiltração eosinofílica, mononuclear e elevação da contagem total de células; não tendo sido evidenciada destruição epitelial, espessamento de membrana basal ou deposição de colágeno subepitelial como o descrito em asma brônquica (1995).

A infiltração eosinofílica torna-se mais evidente e significativa em amostras obtidas após provocação nasal com alérgenos, quando comparadas a amostras de pacientes com rinite alérgica persistente sem provocação, nestes últimos a exposição aos antígenos ocorre de forma mais difusa, prolongada e numa dose menor do que ocorre numa provocação nasal com alérgeno, podendo representar um estágio diferente do processo inflamatório da mucosa nasal (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995).

A relação entre descamação epitelial, expressão clínica de rinite alérgica fora e durante estação polínica em comparação a grupo controle, por amostras pareadas de biópsia nasal, evidenciou relação entre perda da integridade epitelial e acúmulo de

eosinófilos. Também a presença de eosinófilos está associada à perda da integridade epitelial em pacientes com rinite alérgica e não alérgica (AMIN *et al.*, 2001).

Os casos neste estudo foram categorizados pelo grau de lesão epitelial e pela presença de espessamento da membrana basal, para análise comparativa das alterações histopatológicas encontradas em relação aos achados do lavado nasal, ou seja, se o grau de lesão tissular estava ou não associado ao processo inflamatório da luz cavidade nasal.

No presente grupo de pacientes estudados com rinite, sejam atópicos ou não atópicos, à comparação dos achados histopatológicos em relação aos do lavado nasal, observou-se que entre as amostras com algum grau de lesão epitelial, foi semelhante o processo inflamatório na luz da cavidade nasal, em relação a celularidade total e diferencial, bem como aos níveis de albumina e IL-8. Entre os casos que apresentavam lesão epitelial, a única diferença encontrada foi maior contagem absoluta de eosinófilos no LN, no subgrupo dos não atópicos, em comparação aos que não apresentavam lesão epitelial, o que sugere uma participação destas células na lesão ao epitélio, mesmo em não atópicos.

Portanto, apesar de atópicos apresentarem com maior frequência algum grau de lesão epitelial, este achado não se associou a diferenças no processo inflamatório da luz da cavidade nasal, quando comparados a não atópicos. Entretanto, apenas dois atópicos não apresentavam lesão epitelial, o que inviabilizou a comparação deste subgrupo de pacientes.

Ruptura epitelial e descamação são mais pronunciadas na mucosa brônquica de asmáticos que na mucosa nasal de pacientes com rinite, embora a mucosa nasal esteja mais exposta a agentes nocivos e a alérgenos (BOUSQUET *et al.*, 2004). Além disto, na mucosa brônquica uma alteração na expressão de marcador de coesão epitelial se associou a maior descamação epitelial, quando comparada à mucosa nasal dos mesmos pacientes, o que sugere que outros mecanismos além da inflamação eosinofílica, possam estar envolvidos na lesão à mucosa brônquica (CHANEZ *et al.*, 1999).

Nos pacientes estudados, sejam atópicos ou não atópicos, a celularidade total recuperada nas amostras de lavado nasal, que poderia refletir a descamação epitelial, não se associou a presença de lesão epitelial e/ou a presença de espessamento da membrana basal.

O espessamento da membrana basal pode variar de acordo com a região estudada, sendo maior nas áreas com predomínio de epitélio respiratório e menor nas áreas com metaplasia do epitélio, o que sugere um papel protetor na dependência do tipo do epitélio de revestimento, para com a ocorrência de espessamento da membrana basal (AUGUSTO *et al.*, 1999).

Em amostras de biópsia de mucosa brônquica de asmáticos, espessamento de membrana basal não foi um achado uniforme, também não houve associação com gravidade da asma (CHU *et al.*, 1998; WARD *et al.*, 2002).

Em crianças com asma grave foi maior espessamento de membrana basal (7,12µm [6,37-7,89]) em comparação a grupo controle (4,89µm [4,16-6,16]) (BOSSLEY *et al.*, 2012).

Espessamento de membrana basal pode estar presente na mucosa nasal de indivíduos saudáveis, o que não está de todo elucidado (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995; AUGUSTO *et al.*, 1999; AMIN *et al.*, 2001). Por ser a porção anterior do corneto inferior mais exposta ao fluxo aéreo, local onde ocorre maior impacto de aeroalérgenos e irritantes, alguns aspectos do processo inflamatório e achados de remodelamento podem representar uma resposta adaptativa da mucosa nasal e dificulta a comparação de pacientes sem e com rinite (AUGUSTO *et al.*, 1999; SALIB; HOWARTH, 2003).

Avaliação estrutural e ultraestrutural da porção anterior da concha inferior, evidenciou maior quantidade de glândulas mucosas e de infiltrado inflamatório crônico do tipo moderado no córion, além de tendência a maior espessamento da membrana basal (AUGUSTO *et al.*, 1999). Foi descrito que este achado pode estar relacionado à deposição de colágeno, auxiliando na estabilização mecânica do epitélio, para evitar a expansão excessiva da mucosa nasal, mantendo a patência da cavidade nasal (AGHA-MIR-SALIM; RAUHUT; MERKER, 1993). Por outro lado, a inflamação alérgica potencializa e acelera este processo fisiológico de deposição do colágeno na membrana basal da concha inferior (SANAI; NAGATA; KONNO, 1999; CONSTANTINO; MELLO JR, 2009).

Na região anterior da concha inferior, onde predomina epitélio respiratório é maior a proporção de espessamento da membrana basal (AUGUSTO *et al.*, 1999). Entretanto poucos estudos avaliaram a membrana basal reticular nasal por microscopia eletrônica ou imunohistoquímica. Em amostras de biópsias de mucosa nasal de pacientes com rinite alérgica persistente, foi observada metaplasia de células

epiteliais, espessamento da membrana basal reticular, causado pela deposição de colágeno tipos I e III, com tendência à fibrose subepitelial, embora em menor extensão do que na mucosa brônquica (BOUSQUET *et al.*, 2004; SANAI; NAGATA; KONNO, 1999).

O espessamento da zona subepitelial da membrana basal, que corresponde à região imunoreativa para colágeno tipos I e III, foi maior nos alérgicos do que nos não alérgicos. Desta forma, ficou evidenciado em alérgicos, a ocorrência de remodelamento tissular da mucosa nasal, na região da membrana basal. Entretanto, não foi diferente a quantidade total de colágeno em relação aos não alérgicos (BOUSQUET *et al.*, 2004; SANAI; NAGATA; KONNO, 1999).

Nesta casuística, ao se agrupar os casos pelo critério espessamento de membrana basal, observou-se que nas amostras dos atópicos sem espessamento da membrana basal foi maior a infiltração de eosinófilos e de neutrófilos no lavado nasal. Entretanto, presença ou ausência de espessamento de membrana basal, não se associou à contagem total de células recuperadas no LN de atópicos ou não atópicos.

Por outro lado, na presença de espessamento da membrana basal, foi semelhante a contagem de neutrófilos e de eosinófilos no fluido recuperado pelo LN, de atópicos e não atópicos.

Partindo do princípio que espessamento de membrana basal é um marcador de remodelamento, supõe-se que à medida que evolui o processo inflamatório da rinite, a presença de espessamento da membrana basal se associou a semelhante reação inflamatória e proporção de neutrófilos e de eosinófilos recuperados no lavado nasal de pacientes com rinite, sejam eles atópicos ou não atópicos.

Ao se comparar dentro de cada grupo, ou seja, entre os atópicos sem ou com espessamento de membrana basal, não encontramos diferenças quanto a celularidade, albumina e IL-8. Por outro lado, na presença de algum grau de espessamento da membrana basal entre não atópicos, foi maior a proporção de neutrófilos no lavado nasal, sem diferenças nos demais parâmetros de reação inflamatória. Este achado pode relacionar a infiltração neutrofílica ao mecanismo de lesão da mucosa em não atópicos. Também a semelhante proporção de eosinófilos no LN de não atópicos e atópicos, com espessamento da membrana basal, fornece subsídio à participação dos eosinófilos na lesão de mucosa de pacientes com rinite alérgica ou não alérgica.

Estes achados sugerem que em pacientes com rinite, alérgica ou não alérgica, há algumas diferenças no processo inflamatório, entretanto podem resultar em semelhante lesão estrutural à mucosa nasal.

Todavia é controversa a participação de neutrófilos no processo inflamatório da mucosa nasal em rinite não infecciosa. Há descrição de elevação no número de neutrófilos ativados em rinite alérgica (LIM; TAYLOR; NACLERIO, 1995). Outros autores não encontraram diferenças entre pacientes com rinite alérgica e grupo controle quanto ao número de neutrófilos (BENTLEY *et al.*, 1992) ou nível de mieloperoxidase (MPO) na secreção nasal (WANG *et al.*, 1996; KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001); sendo que em estudo anterior foi encontrado maior nível de MPO no grupo controle em comparação aos pacientes com rinite alérgica e asma (KOVALHUK; ROSÁRIO; CARVALHO, 2001).

Asmáticos submetidos à biópsia brônquica apresentaram maior grau de lesão epitelial, predomínio de eosinófilos e maior frequência de células com expressão de citocinas IL-4 e IL-5, entre os atópicos. Por outro lado, nas amostras de asmáticos não atópicos houve predomínio de neutrófilos e de células com expressão de citocina IL-8. Os autores concluíram que é diferente a extensão do processo inflamatório entre asmáticos atópicos e não atópicos. Espessamento da membrana basal também foi descrito em maior extensão em asma atópica em comparação a não atópica (AMIN *et al.*, 2000).

A reação inflamatória na via aérea está associada ao espessamento da membrana basal da mucosa brônquica, independente da gravidade da asma (CHU *et al.*, 1998). Em asmáticos com rinite alérgica persistente, ao se comparar amostras de biópsia nasal e brônquica, a extensão da inflamação eosinofílica, o espessamento da membrana basal e a descamação epitelial foram mais evidentes na mucosa brônquica (CHANEZ *et al.*, 1999).

Lesão epitelial e espessamento de membrana basal são características de remodelamento descritas em asma. Entretanto, o mesmo processo patológico de inflamação eosinofílica heterogênea foi descrito em rinossinusite crônica. Estes achados associados à sobreposição clínica sugerem que ambas as doenças façam parte de uma inflamação da via aérea, que se estende da mucosa nasal até o nível de alvéolos (PONIKAU *et al.*, 2003). O comprometimento de vias aéreas inferiores em pacientes com rinossinusite crônica pode estar relacionado ao infiltrado inflamatório

predominantemente eosinofílico em vias aéreas superiores, encontrado em amostras de lavado de meato médio (RAGAB; CLEMENT; VINCKEN, 2005).

Inflamação crônica e alteração estrutural das vias respiratórias superiores podem fazer parte de processo generalizado de remodelamento que inclui também vias respiratórias inferiores (BRAUNSTAHL, 2005). Como rinite alérgica é fator de risco para o desenvolvimento de asma, reforça a importância da melhor compreensão do remodelamento de vias aéreas superiores, como uma maneira de estudar sua fisiopatologia. Também o bloqueio do efeito de quimiocinas, representa uma nova abordagem terapêutica para o controle da inflamação alérgica (BOUSQUET *et al.*, 2001; BOUSQUET *et al.*, 2004; FERREIRA, 2003).

Se o processo de remodelamento da mucosa nasal inicia tão precocemente quanto na mucosa brônquica, estudos longitudinais para avaliação do efeito do tratamento da rinite alérgica, sobre as alterações estruturais na mucosa nasal, podem permitir a avaliação de como novas estratégias terapêuticas poderiam também prevenir ou reduzir os efeitos ao longo prazo, do remodelamento na mucosa respiratória em vias aéreas inferiores (TULIC; HAMID, 2010).

Foi demonstrado por estudo experimental que a inibição de fatores angiogênicos pode reduzir o remodelamento da mucosa nasal (MOON *et al.*, 2012). Este é um dos primeiros estudos que pode servir de base para investigação de mudanças na abordagem terapêutica, pela melhor compreensão dos mecanismos de remodelamento nasal. Entretanto, não foi evidenciado aumento da neovascularização na mucosa nasal, sendo necessários mais estudos para confirmar a exata relação entre angiogênese e remodelamento da mucosa nasal (DHONG, 2012).

As células recuperadas na luz da cavidade nasal provêm da descamação epitelial e do aumento da permeabilidade vascular. Atópicos sem espessamento de membrana basal, apresentaram maior proporção de neutrófilos no lavado nasal, enquanto que o número de eosinófilos foi limítrofe.. No entanto, considerando-se o espessamento de membrana basal, como um marcador de remodelamento da mucosa respiratória, a medida em que se detectou maior lesão à membrana basal, não foi diferente a contagem diferencial do infiltrado inflamatório destes pacientes com rinite, seja de natureza alérgica ou não alérgica. Entre os não atópicos foi significativo o afluxo de neutrófilos no lavado nasal.

Portanto, em pacientes com rinite, a despeito de algumas diferenças na reação inflamatória, foi semelhante a consequência sobre a mucosa nasal, a medida que se estabelece o remodelamento da mucosa nasal, independente da atopia.

Este achado sugere que pode haver relação entre progressão do processo inflamatório na luz da cavidade nasal e lesão histopatológica da mucosa detectada pelo espessamento da membrana basal, sendo que esta associação independe da presença de atopia em pacientes com rinite.



## 6 CONCLUSÕES

- 1) Pacientes com rinite alérgica apresentaram pontuação de escore de sintomas maior em comparação à rinite não alérgica;
- 2) Obstrução nasal foi um dos sintomas mais frequentes em pacientes com rinite e nos atópicos se associou ao aumento do número de eosinófilos no lavado nasal;
- 3) Neste estudo pacientes atópicos com rinite, apresentaram maior proporção de eosinófilos no lavado nasal, com ponto de corte de 4%;
- 4) Considerando-se o espessamento de membrana basal um marcador de remodelamento da mucosa respiratória, sua presença se associou a semelhante infiltrado inflamatório na luz da cavidade nasal de pacientes com rinite, independente de atopia, e, entre os não atópicos também se associou a significativo afluxo de neutrófilos;

## REFERÊNCIAS

Agha-Mir-Salim P., Rauhut O., Merker H. J. Electron and fluorescence microscopic investigations on composition and structure of the epithelial basement membrane of the human inferior nasal concha. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 250, n. 7, p. 401-7, 1993.

Amin K., Lúdvíksdóttir D., Janson C., Nettelbladt O., Björnsson E., Roomans G.M., *et al.* Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, p. 2295–2301, 2000.

Amin K., Rinne J., Haahtela T., Simola M., Peterson C.G., Roomans G.M., *et al.* Inflammatory cell and epithelial characteristics of perennial allergic and nonallergic rhinitis with a symptom history of 1 to 3 years' duration. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 107, n.2, p. 249-57, 2001.

Anselmo-Lima W. T. Temas de atualização em rinologia: Tratamento cirúrgicos dos cornetos nasais. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 63, n. 3, supl. 4, p. 3-21, 1988.

Augusto A. G. L. B. S., Bussolotti Filho I., Dolci J. E. L., König Júnior B. Estudo Morfofuncional Estrutural e Ultra-Estrutural da Mucosa das Regiões Anteriores do Septo e da Concha Inferior. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 65, n. 6, p. 472-81, 1999.

Balogh K. Mouth, Nose, And Paranasal Sinuses. In: STERNBERG S. S. Histology for Pathologists (2<sup>nd</sup>) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 367-89, 1997.

Bandos R.D., Mello V.R., Ferreira M.D.S., Rossato M., Anselmo-Lima W.T. Estudo clínico e ultraestrutural pós-turbinectomia inferior parcial. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 5, p. 609-16, 2006.

Baraniuk J. N., Petrie K. N., Le U, Tai C., Park Y. Neuropathology in Rhinosinusitis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 5–11, 2005.

Bascom R., Pipkorn U., Lichtenstein L. M., Naclerio R. M. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. Effect of systemic steroid pretreatment. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 138, p. 406-12, 1988.

Baumann R., Rabaszowski M., Stenin I., Tilgner L., Scheckenbach K., Wiltfang J., Schipper J., Chaker A., Wagenmann M. Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 27, n. 4, p. 266-72, 2013.

Bavbek S., Sencer H., Misirligil Z., Beder S., Gurbuz L. Light and electron microscope study in allergic rhinitis patients (ARP) with or without bronchial hyperreactivity (BHR). **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 6, p. 172-82, 1996.

Benson M., Strannegard I. L., Wennergren G., Strannegard O. Cytokines in nasal fluids from school children with seasonal allergic rhinitis. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 8, p. 143-49, 1997.

Benson M., Strannegård I.L., Wennergren G., Strannegård O. Interleukin-5 and interleukin-8 in relation to eosinophils and neutrophils in nasal fluids from school children with seasonal allergic rhinitis. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 10, n. 3, p. 178-85, 1999.

Bentley A. M., Jacobson M. R., Cumberworth V., Barkans J. R., Moqbel R., Schwartz L. B., *et al.* Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, p. 877-83, 1992.

Bernstein I. L., Storms W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of

Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology. **Annals of Allergy Asthma Immunol**, v. 75 (6 Pt 2), p. 543-625, 1995.

Besancon-Watelet C., Bene M. C., Montagne P., Faure G. C., Jankowski R. Eosinophilia and cell activation mediators in nasal secretions. **Laryngoscope**, v. 112, n. 1, p. 43-46, 2002.

Bochner B., Schleimer R. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 94, p. 427-439, 1994.

Bossley C. J., Fleming L., Gupta A., Regamey N., Frith J., Oates T., *et al.* Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 4, p. 974-82, 2012.

Bourdin A., Neveu D., Vachier I., Paganin F., Godard P., Chanez P. Specificity of basement membrane thickening in severe asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 1367-74, 2007.

Bousquet J., Chanez P., Lacoste J. Y., White R., Vic P., Godard P. *et al.* Asthma: a disease remodeling the airways? **Allergy**, v. 47, p. 3-11, 1992.

Bousquet J., Jacquot W., Vignola A. M., Bachert C., Van Cauwenberge P. Allergic rhinitis: A disease remodeling the upper airways? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, p. 43-9, 2004.

Bousquet J., Jeffery P. K., Busse W. W., Johnson M., Vignola A. M. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 1720-45, 2000.

Bousquet J., Van Cauwenberge P., Khaltaev N., Aït-Khaled N., Annesi-Maesano I., Bachert C., *et al.* Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **Allergy**, v. 57, n. 9, p. 841-855, 2002.

Bousquet J., Van Cauwenberge P., Khaltaev N., Aït-Khaled N., Annesi-Maesano I., Bachert C. *et al.* Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 5, p. S147-S336, 2001.

Braunstahl G. J., Fokkens W. J., Overbeek S. E., KleinJan A., Hoogsteden H. C., Prins J. B. Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 579–87, 2003.

Braunstahl G.J. The unified immune system: respiratory tract-nasobronchial interaction mechanisms in allergic airway disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 1, p. 142-8, 2005.

Braunstahl G.J., Overbeek S.E., Fokkens W.J., Kleinjan A., Mceuen A.R., Walls A.F., Hoogsteden H.C., Prins J.B. Segmental bronchial provocation in allergic rhinitis patients affects mast cells and basophil numbers in nasal and bronchial mucosa. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, p. 726-7, 2001.

Braunstahl G.J., Overbeek S.E., Kleinjan A., Prins J.B., Hoogsteden H.C., Fokkens W.J. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, p. 469-76, 2001.

Bush A. How early do airway inflammation and remodeling occur? **Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 57, n. 1, p. 11-9, 2008.

Cavaliere M., Mottola G., Iemma M. Comparison of the effectiveness and safety of radiofrequency turbinoplasty and traditional surgical technique in treatment of inferior turbinate hypertrophy. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 133, p. 972-8, 2005.

Chakir J., Laviolette M., Boutet M., Laliberte R., Dube J., Boulet L. P. Lower airways remodeling in asthmatic subjects with allergic rhinitis. **Laboratory Investigation**, v. 75, p. 735-44, 1996.

Chanez P., Vignola A. M., Vic P., Guddo F., Bonsignore G., Godard P., Bousquet J. Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, p. 588-595, 1999.

Chapman M. D., Wünschmann S., Pomés A. Proteases as Th2 adjuvants. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 7, n. 5, p. 363-7, 2007.

Chawes B.L.K. Upper and lower airway pathology in young children with allergic- and non-allergic rhinitis. **Danish Medical Bulletin**, v.58, n. 5, p. B4278, 2011.

Chawes B. L. K., Kreiner-Møller E., Bisgaard H. Objective assessments of allergic and nonallergic rhinitis in young children. **Allergy**, v. 64, n. 10, p. 1547-53, 2009.

Chen S. T., Sun H. L., Lu K. H., Lue K. H., Chou M. C. Correlation of immunoglobulin E, eosinophil cationic protein, and eosinophil count with the severity of childhood perennial allergic rhinitis. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v.39, p. 212-8, 2006.

Chiappara G., Gagliardo R., Siena A., Bonsignore M. R., Bousquet J., Bonsignore G., Vignola A. M. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 1, n. 1, p. 85-93, 2001.

Chong Neto H. J., Rosário Fº N. A., Westphal G. L. C., Riedi C. A., Santos H. L. B. S. Allergic conjunctivitis in asthmatic children: as common as underreported. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 105, n. 5, p. 399-400, 2010.

Chu H. W., Halliday J.L., Martin R. J., Leung D. Y., Szeffler S. J., Wenzel S. E. Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, n. 6, p. 1936-44, 1998.

Ciprandi G., Buscaglia S., Pesce G., Pronzato C., Ricca V., Parmiani S., *et al.* Minimal persistent inflammation is present at mucosal level in patients with asymptomatic rhinitis and mite allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 96, p. 971-979, 1995.

Ciprandi G., Cirillo I., Pistorio A., Grutta S. Relationship between rhinitis duration and worsening of nasal function **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, v. 138, p. 725-29, 2008.

Ciprandi G., Cirillo I., Vizzaccaro A., Milanese M., Tosca M. A. Correlation of nasal inflammation and nasal airflow with forced expiratory volume in 1 second in patients with perennial allergic rhinitis and asthma. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 93, n. 6, p. 575-80, 2004.

Ciprandi G., Marseglia G., Klersey A., Tosca M. Relationships between allergic inflammation and nasal airflow in children with persistent allergic rhinitis due to mite sensitization. **Allergy**, v. 60, p. 957–60, 2005.

Ciprandi G., Pronzato C., Ricca V., Passalacqua G., *et al.* Allergen specific challenge induces intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1 ou CD54) on nasal epithelial cells in allergic subjects. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 150, p. 1653-59, 1994.

Ciprandi G., Vizzaccaro A., Cirillo I., Tosca M., Massolo A., Passalacqua G. Nasal eosinophils display the best correlation with symptoms, pulmonary function and inflammation in allergic rhinitis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 136, p. 266-72, 2005.

Constantino G. T. L., Mello Jr J. F. Remodelamento das vias aéreas inferiores e superiores. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, n. 1, p. 151-6, 2009.

Cruz A. A., Darze E. S., Santos R. S., Barral A., Carvalho E. M. Preliminary evaluation of a quantitative method of nasal cytology for clinical purposes. **Allergy**, v. 48, n. 16, p. 60, 1993.

De Graaf-In T. V. C., Garrelds I. M., Koenders S., Gerth V. W. R. Relationship between nasal hyperreactivity, mediators and eosinophils in patients with perennial allergic rhinitis and controls. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 26, n. 8, p. 903-8, 1996.

Dhong H. J. Angiogenic factors play a significant role in nasal airway remodeling in allergic rhinitis. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 4, n. 1, p. 2-4, 2012.

Di Lorenzo G., Mansueto P., Melluso M., Candore G., Colombo A., Pellitteri M.E., et al. Allergic rhinitis to grass pollen: measurement of inflammatory mediators of mast cell and eosinophils in native nasal fluid lavage and in serum out of and during pollen season. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 6, p. 832-7, 1997.

Di Lorenzo G., Mansueto P., Pacor M. I., Martinelli N., Rizzo M., Ditta V., et al. Clinical importance of eosinophil count in nasal fluid in patients with allergic and non-allergic rhinitis. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 1077-87, 2009.

Djukanovic R., Lai C. K., Wilson J. W., Britten K. M., Wilson S. J., Roche W. R. et al. Bronchial mucosal manifestations of atopy: a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. **The European Respiratory Journal**, v. 5, p. 538-44, 1992.

Djukanovic R., Roche W. R., Wilson J. W., Beasley C. R., Twentyman O. P., Howarth R. H., et al. Mucosal inflammation in asthma: state of the art. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 142, p. 434-57, 1990.

Dolci J. E. L. Modelo estrutural e ultraestrutural do epitélio da mucosa da concha nasal inferior em pacientes com rinite alérgica. São Paulo, (Doutorado em Otorrinolaringologia). UNIFESP-EPM, 1994.

Durham S. R., Ying S., Varney V. A., Jacobson M. R., Sudderick R. M., Mackay I. S., et al. Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5 e granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. **The Journal of immunology**, v. 148, p. 2390-94, 1992.



Dutra B. M. R. S., Rosário F<sup>o</sup> N.A.R., Zavadniak A. F. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. **Revista Brasileira Alergia Imunopatologia**, v. 24, n. 5, p. 189-95, 2001.

Dykewicz M. S., Fineman S. Executive summary of joint task force practice parameters on diagnosis and management of rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 81, p. 463-68, 1998.

Erel F., Karaayvaz M., Caliskaner A. Z., Gerek M., Demiriz M., Kubar A., *et al.* Effects of allergen immunotherapy on the nasal mucosa in patients with allergic rhinitis. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 10, p. 14-9, 2000.

Esteves P. C., Rosário F<sup>o</sup> N. A. R., Trippia S. G., Caleffe L. G. Sensibilidade atópica em escolares e adultos de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira Alergia Imunopatologia**, v. 22, p. 156-60, 1999.

Ferreira M. A. R. Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of in vivo challenge studies. **Mediators of inflammation**, v. 12, n. 5, p. 259-67, 2003.

Gaga M., Lambrou P., Papageorgiou N., Koulouris N. G., Kosmas E., Fragakis S., *et al.* Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non-atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 663-69, 2000.

Gelardi M., Incorvaia C., Passalacqua G., Quaranta N., Frati F. The classification of allergic rhinitis and its cytological correlate. **Allergy**, v. 66, p. 1615–25, 2011.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA) [homepage on the Internet]. Bethesda: NHLBI/WHO; 2006. Available from: [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com) [update Sep 2006; cited 2006 Sep 27], 2006.

Gluck U., Gebbers J. Epithelial changes in seasonal allergic rhinitis throughout the year: evidence of coexistent air pollution and local secretory IgA deficiency?

**Journal for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery**, v. 62, p. 68-75, 2000.

Gosset P., Tillie-Leblond I., Malaquin F., Durieu J., Wallaert B., Tonnel A. B. Interleukin-8 secretion in patients with allergic rhinitis after an allergen challenge: interleukin-8 is not the main chemotatic factor present in nasal lavages. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 27, p. 379-88, 1997.

Holgate S. T., Davies D. E., Lackie P. M., Wilson S. J., Puddicombe S. M., Lordan J. L. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 2, p. 193-204, 2000.

Holmberg K., Bake B., Pipkorn U. Nasal mucosa blood flow after intranasal allergen challenge. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 81, p. 541-47, 1988.

Howarth P.H., Persson C.G., Meltzer E.O., Jacobson M.R., Durham S.R., Silkoff P.E. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 3, Suppl. 1, p. S414-41, 2005.

Huse D. M., Hartz S. C., Russel M. W., Piercey G., Weiss S. Allergic rhinitis may worsen asthma symptoms in children: the international asthma outcomes registry [abstract]. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 153, p. A 860, 1996.

Igarashi Y., Goldrih M. S., Kaliner M. A., Irani A. M., Schwartz L. B., White M. V. Quantitation of inflammatory cells in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis and normal subjects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 95, p. 716-725, 1995.

International Consensus Report on Diagnosis and Management of Rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. **Allergy**, v. 49, suppl. 19, p. 1-34, 1994.

Ishii J., Naito K., Miyata S., Senoh Y., Yokoyama N., Baba R. An electron microscopic study of the relation between epithelial cell damage and eosinophilia

in the nasal mucosa of patients with nasal allergy. **Alerugi**, v. 49, p. 1156-62, 2000.

IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA. **Revista Brasileira Alergia Immunopatologia**, v. 29, n° 5, p. 222-45, 2006.

Jacobs R. L., Freedman P. M., Boswell R. N. Nonallergic rhinitis with eosinophilia (NARES syndrome). Clinical and immunologic presentation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 67, p. 253, 1981.

Jankowski R., Persoons M., Foliguet B., Coffinet L., Thomas C., Montaut B. V. Eosinophil count in nasal secretions of subjects with and without nasal symptoms. **Rhinology**, v. 38, p. 23-32, 2000.

Jean R., Delacourt C., Rufin P., Pfister A., Waernessyckle S., De Blic J., *et al.* Nasal cytology in rhinitis children: comparison between brushing and blowing the nose. **Allergy**, v. 51, p. 932-4, 1996.

Jeffery P. K. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 15, n. 164 (10 Pt 2), p. S28-38, 2001.

Jeffery P. K., Haahtela T. Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one-airway condition. **BMC pulmonary medicine [electronic resource]**, v. 6, Suppl 1, p. S5, 2006.

Jirapongsananuruk O., Vichyanond P. Nasal cytology in the diagnosis of allergic rhinitis in children. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 80, n. 2, p. 165-70, 1998.

Kaliner M., Lemanske R. Rhinitis and asthma. **Journal of the American Medical Association**, v. 268, n. 20, p. 2807-29, 1992.

Karlsson G., Pipkorn U. Natural allergen exposure does not influence the density of goblet cells in the nasal mucosa of patients with seasonal allergic rhinitis. **Journal for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery**, v. 51, p. 171-174, 1989.

Kay A. B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 30-37, 2001.

Kim C. H., Song M. H., Ahn Y. E., Lee J. G., Yoon J. H. Effect of hypo-, iso- and hypertonic saline irrigation on secretory mucins and morphology of cultured human nasal epithelial cells. **Acta Oto-laryngologica**, v. 125, n. 12, p. 1296-300, 2005.

Kim T. H., Lee J. Y., Lee H. M., Lee S. H., Cho W. S., Ju Y. H., Park E. H., Kim K. W., Lee S. H. Remodelling of nasal mucosa in mild and severe persistent allergic rhinitis with special reference to the distribution of collagen, proteoglycans, and lymphatic vessels. **Clinical And Experimental Allergy: Journal of The British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 40, n. 12, p. 1742-54, 2010.

Kleinjan A., Dijkstra M. D., Boks S. S., Severijnen L. A., Mulder P. G., Fokkens W. J. Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, p. 441-50, 1999.

Kovalhuk L. C. S., Rosário F<sup>o</sup> N. A., Carvalho A., Cruz A. A., Calfele L. G. Computed tomographic study of paranasal sinuses and nasal lavage in atopic children without sinusitis symptoms. **Pediatric Asthma, Allergy & Immunology**, v. 13, n. 3, p. 123-31, 1999.

Kovalhuk L.C.S., Rosário N.A., Carvalho A. Inflammatory mediators, cell counts in nasal lavage and computed tomography of the paranasal sinuses in atopic children **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 77, n. 4, p. 271-8, 2001.

Laitinen L. A., Heino M., Laitinen A., Kava T., Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. **The American Review of Respiratory Disease**, v.131, p. 599-606, 1985.

Laliberte F., Laliberte M. F., Lecart S., Bousquet J., Klossec J. M., Mounedji N. Clinical and pathologic methods to assess the long-term safety of nasal

corticosteroids. French Triamcinolone Acetonide Study Group. **Allergy**, v. 55, p. 718-22, 2000.

Lee H. S., Majima Y., Sakakura Y., Shinogi J., Kawaguchi S., Kim B. W. Quantitative cytology of nasal secretions under various conditions. **Laryngoscope**, v. 103, n. 5, p. 533-7, 1993.

Leynaert B., Bousquet J., Neukirch C., Liard R., Neukirch F. Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: Results from the European Community Respiratory Health Survey. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, n. 2, p. 301-4, 1999.

Leynaert B., Neukirch F., Demoly P., Bousquet J. Epidemiologic evidence for asthma and rhinitis comorbidity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 5, p. S201-S205, 2000.

Lim M. C., Taylor R. M., Naclerio R. M. The histology of allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, p. 136-44, 1995.

Linna O., Kokkonen J., Lukin M. A 10-year prognosis for childhood allergic rhinitis. **Acta paediatrica**, v. 81, p. 100-102, 1992.

Liu F., Zhang J., Liu Y., Zhang N., Holtappels G., Lin P., Liu S., Bachert C. Inflammatory profiles in nasal mucosa of patients with persistent vs intermittent allergic rhinitis. **Allergy**, v. 65, n. 9, p. 1149-57, 2010.

Lopez-Guisa J. M., Powers C., File D., Cochrane E., Jimenez N., Debley J. S. Airway epithelial cells from asthmatic children differentially express proremodeling factors. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 4, p. 990-7, 2012.

Mallol J., Crane J., Von Mutius E., Odhiambo J., Keil U., Stewart A. ISAAC Phase Three Study Group. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: a global synthesis. **Allergologia et immunopathologia (Madrid)**, v. 41, n. 2, p. 73-85, 2013.

Malmberg H. Symptoms of chronic and allergic rhinitis and occurrence of nasal secretion granulocytes in university students, school children and infants. **Allergy**, v. 34, p. 389-94, 1979.

Meltzer E. O. Evaluating rhinitis: Clinical, rhinomanometric, and cytologic assessments. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 82, n. 5, part 2, p. 900-8, 1988.

Meltzer E. O., Blaiss M. S., Naclerio R. M., Stoloff S. W., Derebery M. J., Nelson H. S., Boyle J. M., Wingertzahn M. A. Burden of allergic rhinitis: allergies in America, Latin America, and Asia-Pacific adult surveys. **Allergy And Asthma Proceedings : The Official Journal of Regional and State Allergy Societies**, v. 33, Suppl. 1, p. S113-41, 2012.

Meltzer E. O., Jalowayski A. A., Vogt K., Iezzoni D., Harris A. G. Effect of desloratadine therapy on symptom scores and measures of nasal patency in seasonal allergic rhinitis: results of a single-center, placebo-controlled trial. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 96, p. 363–368, 2006.

Minshall E., Ghaffar O., Cameron L., O'Brien F., Quinn H., Rowe-Jones J., *et al.* Assessment by nasal biopsy of long-term use of mometasone furoate aqueous nasal spray (Nasonex) in the treatment of perennial rhinitis. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 118, p. 648-54, 1998.

Molgaard E., Thomsen S. F., Lund T., Pedersen L., Nolte H., Backer V. Differences between allergic and nonallergic rhinitis in a large sample of adolescents and adults. **Allergy**, v. 62, n. 9, p. 1033-7, 2007.

Moon I. J., Kim D.Y., Rhee C. S., Lee C. H., Min Y. G. Role of angiogenic factors in airway remodeling in an allergic rhinitis murine model. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 4, p. 37-45, 2012.

Mori S., Fujieda S., Sunaga H., Fox S.B., Saito H. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascularity in the nasal mucosa from allergic rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 1637-44, 2000.

Mori S., Pawankar R., Ozu C., Nonaka M., Yagi T., Okubo K. Expression and Roles of MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, and TIMP-2 in Allergic Nasal Mucosa. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 4, n. 4, p. 231-39, 2012.

Naclerio R. M., Meier H. L., Kagey-Sobotka A., Adkinson N., Meyers D. A., Normam P.S., *et al.* Mediator release after nasal airway challenge with allergen. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 128, p. 597-602, 1983.

Nair P., Goodwin S., Hargreave F.E. Reproducibility, validity, and responsiveness of cell counts in blown nasal secretions. **Allergy and rhinology (Providence)**, v. 2, n. 1, p. 3-5, 2011.

Ozdoganoglu T., Songu M. The burden of allergic rhinitis and asthma. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 6, n. 1, p. 11-23, 2012.

Panettieri R. A. Jr. Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, suppl 6, s. 269-74, 2002.

Pascual R. M., Peters S. P. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 3, p. 477-86, 2005.

Payne D. N., Rogers A. V., Adelroth E., Bandi V., Guntupalli K. K., Bush A., Jeffery P. K. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 1, p. 78-82, 2003.

Pelikan Z. Cytological changes in nasal secretions accompanying delayed nasal response to allergen challenge. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 27, n. 5, p. 345-53, 2013.

Pelikan Z., Pelikan-Filipek M. Cytologic changes in the nasal secretions during the late nasal response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 83, p. 1068-1079, 1989.

Pizzichini E., Pizzichini M. M., Kidney J. C., Efthimiadis A., Hussack P., Popov T., Cox G., Dolovich J., O'byrne P., Hargreave F. E. Induced sputum,

bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. **The European Respiratory Journal**, v. 11, p. 828–34, 1998.

Pizzichini E., Pizzichini M.M., Efthimiadis A., Evans S., Morris M.M., Squillace D., Gleich G. J., Dolovich J., Hargreave F. E. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, n. 2, pt. 1, p. 308-17, 1996.

Ponikau J. U., Sherris D. A., Kephart G. M., Kern E. B., Gaffey T. A., Tarara J. E., *et al.* Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: Is the histopathology similar to asthma? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.112, p. 877-82, 2003.

Powe D. G., Jagger C., Kleinjan A., Carney A. S., Jenkins D., Jones N. S. “Entopy”: localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 1374-9, 2003.

Prat J., Xaubet A., Mullol J., Plaza V., Picado C. Cell content and albumin concentration in nasal lavage from patients with rhinitis. **Annals of Allergy**, v. 70, n. 2, p. 175-8, 1993.

Quirce S., Lemie` Re C., De Blay F., Del Pozo V., Gerth Van Wijk R., Maestrelli P. *et al.* Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. **Allergy**, v. 65, p. 445–58, 2010.

Ragab A., Clement P., Vincken W. Correlation between the cytology of the nasal middle meatus and BAL in chronic rhinosinusitis. **Rhinology**, v.43, p. 11-17, 2005.

Raphael G. D., Druce H.M., Baraniuk J.N., Kaliner M. Pathophysiology of rhinitis – Assessment of the sources of protein in methacoline-induced nasal secretions. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 138, p. 413-20, 1988.



Raphael G. D., Igarashi Y., White M. V., Kaliner A. K. The pathophysiology of rhinitis – Sources of protein in allergen-induced nasal secretions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 88, p. 33 – 42, 1991.

Raphael G. D., Meredith S. D., Baraniuk J. N., Druce H. M., Banks S. M., Kaliner M. A. The pathophysiology of rhinitis. II. Assessment of the sources of protein in histamine-induced nasal secretions. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 139, n. 3, p. 791-800, 1989.

Redington A. E., Roche W. R., Madden J., Frew A. J., Djukanovic R., Holgate S. T. *et al.* Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, p. 384-87, 2001.

Riedi C. A., Rosário N. A., Ribas L. F. O., Backes A. S., Kleiniibing G. F., Popija M., *et al.* Increase in prevalence of rhinoconjunctivitis but not asthma and atopic eczema in teenagers. **J Invest Allergol Clin Immunol**, v. 15, n. 3, p. 183-188, 2005.

Romero J. N., Scadding G. Eosinophilia in nasal secretions compared to skin prick test and nasal challenge test in the diagnosis of nasal allergy. **Rhinology**, v. 30, p. 169-75, 1992.

Rondón C., Canto G., Blanca M. Local allergic rhinitis: a new entity, characterization and further studies. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2010.

Rondón C., Romero J. J., López S., Antúnez C., Martín-Casañez E., Torres M. J. *et al.* Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 899-905, 2007.

Rosário Fº N. A. R. Sensibilização atópica a aeroalérgenos em crianças asmáticas em Curitiba. **Jornal Paranaense de Pediatria Curitiba**, v. 3 n. 4 p. 80 – 82, 2002.

Rosário F<sup>o</sup> N.A.R., Baggio D., Suzuki M.M. Ácaros na poeira domiciliar em Curitiba. **Revista Brasileira Alergia Immunopatologia**, v. 25, p. 15-25, 1992.

Roseler S., Holtappels G., Wagenmann M., Bachert C. Elevated levels of interleukins IL-1 beta, IL-6 and IL-8 in naturally acquired viral rhinitis. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 1, p. S61-S63, 1995.

Saglani S., Payne D. N., Zhu J., Wang Z., Nicholson A. G., Bush A., and Jeffery P. K. Early Detection of Airway Wall Remodeling and Eosinophilic Inflammation in Preschool Wheezers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 9, p. 858-64, 2007.

Salib R. J., Howarth P. H. Remodelling of the upper airways in allergic rhinitis: is it a feature of the disease? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 1629–33, 2003.

Sanai A., Nagata H., Konno A. Extensive interstitial collagen deposition on the basement membrane zone in allergic nasal mucosa. **Acta Oto-laryngologica**, v. 119, p. 473-78, 1999.

Scadding G. K. Non-allergic rhinitis: diagnosis and management. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 1, p. 15-20, 2001.

Serrano C. D., Valero A., Bartra J., Roca-Ferrer J., Muñoz-Cano R., Sánchez-López J., Mullol J., Picado C. Nasal and bronchial inflammation after nasal allergen challenge: assessment using noninvasive methods. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 22, n. 5, p. 351-6, 2012.

Shaida A., Kenyon G., Devalia J., Davies R.J., Macdonald T. T., Pender S. L. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, p. 791-6, 2001.

Sim T. C., Grant J. A., Hilsmeier K. A., Fukuda Y., Alam R. Proinflammatory cytokines in nasal secretions of allergic subjects after antigen challenge.

**American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, p. 339-44, 1994.

Simon H. U., Blaser K. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? **Immunology Today**, v. 16, p. 53-55, 1995.

Solé D., Mello Júnior J.F., Weckx L.L.M., Rosário Filho N.A., *et al.* II Consenso Brasileiro sobre Rinites. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 29, n° 1, p. 29-58, 2006.

Solé D., Wandalsen G. F., Camelo-Nunes I. C., Naspitz C. K., ISAAC - Grupo Brasileiro. Prevalência de sintomas de asma, rinite e eczema atópico entre crianças e adolescentes brasileiros identificados pelo International Study of Asthma and Allergies (ISAAC) - Fase 3. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 82, n. 5, p. 341-6, 2006.

Solé D., Mallol J., Camelo-Nunes I.C., Wandalsen G.F. Prevalence of rhinitis-related symptoms in Latin American children - results of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase three. Latin American ISAAC Study Group. **Pediatric Allergy and Immunology**. v. 21, n. 2, p. 127-36, 2010.

Souza C. C. T. Padrão de alérgenos inaláveis na poeira domiciliar em pacientes atópicos de Curitiba. 100 f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

Svensson C., Andersson M., Greiff L., Alkner U., Persson C. G. Exudative hyperresponsiveness of the airway microcirculation in seasonal allergic rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 25, n. 10, p. 942-50, 1995.

Terada N., Hamano N., Kim W.J., Hirai K., Nakajima T., Yamada H., *et al.* The kinetics of allergen-induced eotaxin level in nasal lavage fluid: its key role in eosinophil recruitment in nasal mucosa. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, p. 575-9, 2001.

Terada N., Konno A., Fukuda S., Yamashita T., Shirotori K., Okamoto Y., *et al.* Interleukin-5 in nasal lavage fluid after antigen challenge. **Acta Otolaryngologica Stockholm**, v. 114, p. 203-8, 1994.

Thavagnanam S., Parker J. C., McBrien M. E., Skibinski G., Shields M. D., Heaney L. G. Nasal epithelial cells can act as a physiological surrogate for paediatric asthma studies. **PloS one [electronic resource]**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2014.

Togias A. Age relationships and clinical features of nonallergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 85, p. 182, 1990.

Tulic M. K., Hamid Q. Does airway remodelling occur in the upper airways of patients with allergic rhinitis? **Clinical & Experimental Allergy**, v. 40, p. 1714–16, 2010.

Varney V. A., Jacobson M. R., Sudderick R. M., Robinson D. S., Irani A. M., Schwartz L. B., *et al.* Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils, and neutrophils. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 146, n. 1, p. 170-6, 1992.

Ventura M. T., Tounghousova O., Barbaro M. P., Resta O., Carpagnano G. E., Dragonieri S., *et al.* Validity and reproducibility of morphologic analysis of nasal secretions obtained using ultrasonic nebulization of hypertonic solution. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 99, n. 3, p. 232-5, 2007.

Vignola A.M., Chanez P., Campbell A.M., Souques F., Lebel B., Enander I., *et al.* Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, p. 403-9, 1998.

Vignola A.M., Mirabella F., Costanzo G., Di Giorgi R., Gjomarkaj M., Bellia V., *et al.* Airway remodeling in asthma. **Chest**, v. 123, p. 417–22, 2003.

Wallace D. V., Dykewicz M. S., Bernstein D. I., Blessing-Moore J., Cox L., Khan D. A. *et al.* The diagnosis and management of rhinitis: an updated practice

parameter. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v.122, (2 Suppl), p. S1-84, 2008.

Wan H., Winton H. L., Soeller C., Gruenert D. C., Thompson P. J., Cannell M. B., Stewart G. A., Garrod D. R., Robinson C. Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1. **Clinical and Experimental Allergy** , v. 30, n. 5, p. 685-98, 2000.

Wan H., Winton H. L., Soeller C., Tovey E. R., Gruenert D. C., Thompson P. J., Stewart G. A., Taylor G. W., Garrod D. R., Cannell M. B., Robinson C. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 1, p. 123-33, 1999.

Wang D., Smitz J., Derde M. P., Clement P. Concentrations of myeloperoxidase in nasal secretions of atopic patients after nasal allergen challenge and during natural allergen exposure. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 110, p. 85-90, 1996.

Wang D.Y., Clement P. Pathogenic mechanisms underlying the clinical symptoms of allergic rhinitis. **American Journal of Rhinology**, v. 14, n. 5, p. 325-33, 2000.

Ward C., Pais M., Bish R., Reid D., Feltis B., Johns D., Walters E. H. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. **Thorax**, v. 57, p. 309–16, 2002.

Watanabe K., Kiuna C. Epithelial damage of nasal mucosa in nasal allergy. **Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology**, v. 107, p. 564-70, 1998.

Watelet J. B., Van Cauwenberge P. Applied anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. **Allergy**, v.54 (Suppl. 57):14–25, 1999.

Watelet J. B., Van Zele T, Gjomarkaj M., Canonica G. W., Dahlen S. E., Fokkens W. *et al.* Tissue remodelling in upper airways: where is the link with lower airway remodelling? **Allergy**, v.61, p. 1249–58, 2006.

Wright A. L., Holberg C. J., Martinez F. D., Halonen M., Morgan W., Taussig L. M. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. **Pediatrics**, v. 94, p. 895-901, 1994.

Xing Z., Ohtoshi T., Ralph P., Gauldie J., Jordana M. Human upper airway structural cell-derived cytokines support human peripheral blood monocyte survival: a potential mechanism for monocyte/macrophage accumulation in the tissue. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 6, p. 212-18, 1992.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O estudo intitulado “Estudo comparativo do processo inflamatório alérgico do lavado nasal e histologia da mucosa nasal” sob responsabilidade da Dra Loreni C. S. Kovalhuk, tem por objetivo avaliar o grau do processo inflamatório em amostras de lavado nasal e comparar com as amostras do material obtido por cirurgia nasal à qual você será submetido.

Por intermédio de pesquisas clínicas ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância. Você está sendo convidado a participar deste estudo, e, caso concorde em participar será feita uma avaliação médica pela Dra Loreni (consulta e exame clínico), teste alérgico e coleta de secreção do nariz, a qual consiste em aplicar 1mL de soro fisiológico a 0,9% no nariz, com a cabeça inclinada para trás, após 10 segundos deve-se inclinar a cabeça para frente para coletar a amostra de soro fisiológico que retorna, este procedimento será repetido por 5 vezes em cada lado do nariz. O material assim obtido será analisado para graduar a intensidade da reação inflamatória no nariz e comparar com a análise da amostra obtida pela cirurgia do nariz.

Como em qualquer exame, você poderá sentir algum desconforto, para a coleta do lavado nasal será necessário prender a respiração por alguns segundos após a aplicação do soro fisiológico no nariz; para o teste alérgico serão aplicadas 4 gotas no antebraço seguida de puntura (leve picada) e caso a reação seja positiva, ficará vermelho e irá coçar por poucos minutos.

Os benefícios esperados com a sua participação são: auxiliar na avaliação e compreensão do processo da inflamação nasal, alérgica ou não alérgica, o que poderá futuramente auxiliar na avaliação dos efeitos de medicamentos para uso nasal.

A Dra Loreni C. S. Kovalhuk é a responsável pela pesquisa e poderá ser contatada pelos telefones: 3360-1800 (ramal: 6216) ou 9113-0070.

A sua participação é voluntária, tendo a liberdade de recusar em participar do estudo, sendo que este fato não resultará na interrupção de seu atendimento. Caso aceite participar, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, se julgar necessário.

As informações relacionadas aos resultados do estudo poderão ser publicadas em artigos de revistas médicas, isto será feito de maneira que sua identidade seja mantida confidencial. Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são da responsabilidade do paciente.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi o objetivo e os métodos do estudo do qual fui convidado a participar. As explicações que recebi mencionam os potenciais benefícios e desconfortos do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete o tratamento médico.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_



## ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR



Curitiba, 31 de março de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Dra. Loreni Carneiro de Siqueira Kovalhuk**  
Nesta

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que a **Solicitação de Alteração do Título da Pesquisa**, de: “ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO ALÉRGICO DO TRATO RESPIRATÓRIO PELA CITOMETRIA DE FLUXO E ANÁLISE QUANTITATIVA DA CELULARIDADE DO LAVADO NASAL” para: “*ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO ALÉRGICO DO TRATO RESPIRATÓRIO, PELA ANÁLISE QUANTITATIVA DA CELULARIDADE DO LAVADO NASAL E IMUNO-HISTOLOGIA DA MUCOSA NASAL*”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. O referido documento atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

**Registro CEP/HC 755.174/2003-11**

Atenciosamente,

**Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

## ANEXO 3 – FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA – APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO PARANÁ

**FUNDAÇÃO  
ARAUCÁRIA**

*Apoio ao Desenvolvimento Científico  
e Tecnológico do Paraná*

### RELATÓRIO TÉCNICO FINAL

Programa <b>APOIO A PROJETOS DE PESQUISA BÁSICA E APLICADA</b>		
Chamada/ano 1/2005	Convênio nº 016/2005	Protocolo nº5877
Coordenador Loreni C. S. Kovalhuk		E-mail: <a href="mailto:lorenikovalhuk@hotmail.com">lorenikovalhuk@hotmail.com</a>
Instituição Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná		Área Ciências da Saúde
Título do Projeto Estudo comparativo do processo inflamatório alérgico do trato respiratório, pela análise quantitativa da celularidade do lavado nasal e imuno-histologia da mucosa nasal		
Valor financiado R\$4.881,54		

#### RESUMO DO PROJETO:

Estudos clínicos, epidemiológicos e fisiopatológicos evidenciam uma forte associação entre rinite e asma, o que levou ao conceito de via aérea única, influenciada por processo inflamatório comum, o qual pode ser mantido ou amplificado por mecanismos interligados. Rinite alérgica está correlacionada e constitui fator de risco para a ocorrência de asma. A associação entre rinite e asma parece ser mais freqüente em rinite persistente do que intermitente.

Remodelamento da via aérea se caracteriza por aumento do desprendimento epitelial, pseudofibrose da membrana basal, entre outras características, as quais são mais pronunciadas na asma que na rinite e podem estar associadas à atividade secretora de células da musculatura lisa. Por outro lado, citocinas e mediadores liberados por células estruturais, inflamatórias ou epiteliais circunvizinhas aumentam a resposta contrátil da musculatura lisa. É possível que algumas diferenças no grau de remodelamento, das mucosas nasal e brônquica, se devam a interação do epitélio com outras células mesenquimais e células da musculatura lisa.

Estes achados dão subsídios para o emprego de um método simples e não invasivo de investigação dos mecanismos inflamatórios envolvidos nas doenças respiratórias alérgicas, pois a cavidade nasal é a primeira região do trato respiratório a ter contato com aeroalérgenos, irritantes e poluentes, sendo de fácil acesso para coleta de amostra de material.

A análise simultânea do infiltrado celular e do grau de ativação celular em amostras de secreção nasal e de biópsia de mucosa nasal mostra diferenças entre os dois compartimentos, portanto o emprego de métodos fidedignos para o estudo do processo inflamatório em amostras obtidas pelo lavado nasal e amostras de mucosa nasal obtidas por turbinectomia, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na reação inflamatória nasal alérgica ou não alérgica.

## **FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA**

*Apoio ao Desenvolvimento Científico  
e Tecnológico do Paraná*

### **ANTECEDENTES:**

A análise do infiltrado inflamatório da mucosa nasal pela técnica semiquantitativa do lavado nasal previamente empregada em adultos e em crianças atópicas está estabelecida como instrumento de pesquisa não invasivo para análise morfológica das células inflamatórias, quantificação do infiltrado inflamatório e avaliação dos mediadores da reação inflamatória na via aérea.

A mucosa nasal pela facilidade de acesso permite a obtenção de material para análise das diferentes células e mediadores envolvidos no processo inflamatório das vias aéreas. O remodelamento da via aérea é um processo patológico estabelecido na asma, porém sua ocorrência não está definida na rinite.

### **Objetivos:**

1º - Avaliação simultânea e comparação do infiltrado celular em amostras do lavado e da mucosa nasal, de indivíduos normais e de pacientes com rinite crônica, com ou sem asma associada.

2º - Comparação da extensão do processo inflamatório (infiltração celular e mediadores) na cavidade e na mucosa nasal.

### **RESULTADOS:**

Término da coleta de dados em fevereiro/2010, em fase de análise do material coletado com previsão de tempo de 3 meses para conclusão desta análise.

#### **1. EQUIPE EFETIVA:**

- Lorení C. S. Kovalhuk: Pesquisadora. Pós-graduação: Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente. UFPR
2. Nelson Augusto Rosário Filho: Orientador. Pós-graduação: Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente. UFPR
3. Ederaldo Telles e Lúcia Noronha: Co-orientadora. Serviço de Anatomia Patológica . UFPR

---

### **SÍNTESE DAS ATIVIDADES REALIZADAS** e principais resultados obtidos

Término da coleta de dados em fevereiro/2010

Total de casos incluídos = 70

Em análise do material coletado

### **PUBLICAÇÕES/PATENTES:**

Após término da análise do material coletado

### **DIFICULDADES ENCONTRADAS/SUGESTÕES:**

O projeto de pesquisa: "Estudo comparativo do processo inflamatório alérgico do trato respiratório, pela citometria de fluxo e análise quantitativa da celularidade do lavado nasal", registrado na Fundação Araucária: sob o número de Protocolo 5877 – Chamada 1 – Convênio 16/05; necessitou de alteração metodológica pela indisponibilidade do equipamento para citometria de fluxo, sendo então substituída a análise da amostra do lavado nasal pelo método de enzimaímunoensaio para os mediadores inflamatórios IFN- $\gamma$ ,



## FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA

Apoio ao Desenvolvimento Científico  
e Tecnológico do Paraná

IL-4, IL-5, IL-8 e imunoensaio turbidimétrico para determinação de microalbumina. Para complementação da investigação foi acrescentada a análise histopatológica das amostras da mucosa nasal obtidas por turbinectomia. O título do projeto passa a ser "Estudo comparativo do processo inflamatório alérgico do trato respiratório, pela análise quantitativa da celularidade do lavado nasal e imuno-histologia da mucosa nasal", sendo que os objetivos não serão alterados, apenas o método de investigação.

### SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS

PRODUÇÃO TÉCNICA-CIENTÍFICA	QUANTIDADE
Produto Tecnológico*	
Processo ou Técnica*	1
Software	
Cartas, Mapas e Similares	
Desenvolvimento de Material Didático ou Instrucional	
Maquete	
Programa de Rádio ou TV	
Curso de Curta Duração Ministrado	
Manutenção de Obra Artística	
Editoração	
Organização de Evento	
Relatório de Pesquisa	
Trabalhos Técnicos	
Outros (especificar)	
* Indicar o nº do Depósito de Patente quando houver	

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	QUANTIDADE	
	Nacionais	Estrangeiras
Livro e Capítulo de Livros		
Artigo Publicado em Periódicos		
Trabalho Publicado em Anais de Evento		
Texto em Jornal ou Revista		
Tradução		
Prefácio, posfácio		
Partitura Musical		
Outra Produção Bibliográfica		

PRODUÇÃO ARTÍSTICA E CULTURAL	QUANTIDADE
Apresentação de Obra Artística	
Arranjo Musical	
Composição Musical	
Curso de Curta Duração	
Obra de Artes Visuais	
Programa de Rádio ou TV	
Sonoplastia	
Outra Produção Artística/Cultural	

# FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA

Apoio ao Desenvolvimento Científico  
e Tecnológico do Paraná

FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS	QUANTIDADE
Alunos de Doutorado	1
Alunos de Mestrado	
Alunos de Aperfeiçoamento ou Especialização	
Alunos de Graduação/Iniciação Científica	

ORIENTAÇÃO CONCLUÍDA	QUANTIDADE
Tese de Doutorado	1
Dissertação de Mestrado	
Monografia de Conclusão Curso de Aperfeiçoamento ou Especialização	
Trabalho de Iniciação Científica	
Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação	

MELHORIA DA INFRA-ESTRUTURA DE PESQUISA/ENSINO	DESCRIÇÃO
Instalação de Laboratório	
Infra-estrutura laboratorial	
Atualização de acervo da Biblioteca	
Outra	

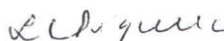
**BENS PATRIMONIÁVEIS:** Listar todos os equipamentos patrimoniáveis, com descrição de Marca, Modelo, Série, acessórios, etc., adquiridos com recursos da Fundação Araucária

IMPACTOS E UTILIDADE DOS RESULTADOS OBTIDOS (até 10 linhas cada)
ECONÔMICO:
SOCIAL:
AMBIENTAL:
CIENTÍFICO (Acadêmico): Viabilidade de execução de projeto de pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente HC-UFPR/Nível de Doutorado.

## PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE

Estabelecida a técnica do processamento do lavado nasal como método de pesquisa para futuros trabalhos na área de alergia respiratória

Local e Data:

  
Assinatura Coordenador  
Dra. Loreni C. S. Kovalchuk  
Alergia e Imunologia  
CRM 11620

  
Assinatura Responsável pela Instituição  
Ul. Nelson A. Rosano Filho  
CRM 3330  
CPF 157.496.259-34

Obs.: Este relatório deve obrigatoriamente acompanhar a prestação de contas

## APÊNDICES

**APÊNDICE 1 – CUSTOS DOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA PESQUISA**

EQUIPAMENTO	CUSTO
Citocentrífuga eletrônica refrigerada, modelo 818 E, Drucker Company	12.250,00
Citocentrífuga LABHO CT-12	6.000,00
Microscópio Wild Heebrugg - 25134 - Switzerland	4530,00
Hemocitômetro - Câmara de Neubauer, Resistance W, Germany	79,84
Somatório	22.859,84

FONTE: O autor (2014)

## APÊNDICE 2 – CUSTOS DOS MATERIAIS UTILIZADOS NA PESQUISA

MATERIAIS	CUSTO UNITARIO	CUSTO TOTAL
3 caixas de lâminas para microscopia com área fosca	4,80	14,40
1 caixa de papel filtro (Shandon Soutern Instruments)	249,00	249,00
Somatório		263,40
<i>KITS ‡</i>		
Albumina	200,00	200,00
Human IL-4 ELISA MAX TM Standard	225,00	225,00
Human IL-5 ELISA MAX TM Standard	225,00	225,00
Human IL-8 ELISA MAX TM Standard	225,00	225,00
Human IFN-g ELISA MAX TM Deluxe	295,00	295,00
Somatório		1170,00

FONTE: O autor (2014)

NOTA: ‡ Custo em dólar



**APÊNDICE 3 – CORRELAÇÃO (PEARSON) DA CELULARIDADE, ALBUMINA E IL-8 DO LAVADO NASAL DE ATÓPICOS (n=36)**

	Nºtotal celsx 10 <sup>3</sup>	Eos %	Neut %	Albumina (µg/mL)	IL-8 (pg/mL)
Nºtotal celsx 10 <sup>3</sup>	x	n=32 r = - 0,13 Exclui: Eos>40% e Total células>2.000 x 10 <sup>3</sup>	r= 0,28	n=33 r=0,20 Exclui: Total células >900	n=34 r=0,28 (Exclui IL8>300 e Total células >800)
Eos %		x	r= - 0,24	n=35 r= - 0,03 Exclui albumina > 300	n=33 r= - 0,16 Exclui: IL8>1200 e Eosinófilos>40%
Neut %			x	r= 0,01	n=35 r=0,19 Exclui: IL8>1200
Albumina (µg/mL)				x	n=31 r=0,01 Exclui: Albumina>100

**APÊNDICE 4 - CORRELAÇÃO (PEARSON) DA CELULARIDADE, ALBUMINA E IL-8 DO LAVADO NASAL DE NÃO ATÓPICOS (n=20)**

	Nºtotal celsx 10 <sup>3</sup>	Eos %	Neut %	Albumina (µg/mL)	IL-8 (pg/mL)
Nºtotal celsx 10 <sup>3</sup>	x	n= 19 r= - 0,05 Exclui: Eosinófilos > 20%	r=0,24	n=19 r= 0,28 Exclui: Albumina > 100	n=19 r=0,23 Exclui: Total Células>680x10 <sup>3</sup> e IL8>600
Eos %		x	r= - 0,02	n=18 r= - 0,26 Exclui: Albumina>100 e Eosinófilos >20%	n=18 r= - 0,02 Exclui: IL8>600 e Eosinófilos>20%
Neut %			x	n=19 r= - 0,06 Exclui: Albumina > 100	n=19 r=0,108 Exclui: IL8>600
Albumina (µg/mL)				x	n=18 r= 0,17 Exclui: IL-8>600 e Alb>100

## APÊNDICE 5 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RESULTADOS DA ANÁLISE DO LAVADO NASAL DOS PACIENTES ASMÁTICOS

	Caso 32	Caso 41
Gênero	F	M
Idade (a)	49	42
Pontuação de sintomas de rinite	7	8
Pontuação de sinais de rinite	11	6
Pontuação total de rinite	18	14
Pontuação de asma	16	22
TCA Dp	++	+++
TCA Lp	++++	+
Número total de células no LN	$50 \times 10^3$	$2.484,9 \times 10^3$
Neutrófilos (%)	66	87
Eosinófilos (%)	8	1
Albumina ( $\mu\text{g/mL}$ )	15	7
IL-8 ( $\text{pg/mL}$ )	30	571

**APÊNDICE 6 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RESULTADOS DAS ANÁLISES  
DO LAVADO NASAL E HISPATOLÓGICA DOS PACIENTES COM  
EROSÃO COMPLETA DO EPITÉLIO**

	Caso 20	Caso 33
Gênero	M	F
Idade (a)	18	20
Pontuação de sintomas de rinite	0	5
Pontuação de sinais de rinite	5	5
Grau de aumento de volume de cornetos	3	2
Pontuação total de rinite	5	10
TCA Dp	-	++++
TCA Lp	-	+
Número total de células no LN	$248 \times 10^3$	$78 \times 10^3$
Neutrófilos (%)	10	1
Eosinófilos (%)	1	3
Albumina ( $\mu\text{g/mL}$ )	40	18
IL-8 ( $\text{pg/mL}$ )	30	30
Estadiamento do espessamento da membrana basal (0-2)	0	1

## PRODUÇÃO ACADÊMICA



0021-7557/01/77-04/271

Jornal de Pediatria

Copyright © 2001 by Sociedade Brasileira de Pediatria

## ORIGINAL ARTICLE

## *Inflammatory mediators, cell counts in nasal lavage and computed tomography of the paranasal sinuses in atopic children*

Loreni C.S. Kovalhuk,<sup>1</sup> Nelson A. Rosário,<sup>2</sup> Arnolfo Carvalho<sup>3</sup>**Abstract**

**Objective:** the aims of this study were to evaluate inflammatory cells, the profile of inflammatory mediators in nasal lavage (NL), and the involvement of the paranasal mucosa in atopic infants with no symptoms of sinusitis.

**Methods:** 48 atopic patients with allergic rhinitis (AR), and 33/48 patients with asthma were studied; the control group consisted of 13 nonatopic children. Those individuals with acute, chronic or recurrent sinusitis were excluded. The involvement of the paranasal mucosa was assessed by coronal computed tomography (CT) and graded by a standard protocol (0-30). A CT score greater than or equal to 12 indicated extensive involvement. Nasal lavage was used to quantify total and differential nasal cell counts. An aliquot of the supernatant was used for determining inflammatory mediators: interleukin-8 (IL-8), myeloperoxidase (MPO), and eosinophil cationic protein (ECP). Albumin was used as a marker for increased vascular permeability. These measurements were performed on all of the atopic patients and in 6/13 patients in the control group. The three groups were submitted to spirometry and complete blood cell count.

**Results:** extensive involvement of the paranasal mucosa was observed in 7/33 (21%) of asthmatic patients (Group I) and 2/15 (13%) of those with allergic rhinitis (Group II). The highest CT score in the control group (Group III) was 7. Total cell and eosinophil count/ml and albumin concentration in nasal fluid were higher in asthmatic patients whose CT score was greater than 12. Interleukin-8 concentration, number of neutrophils and epithelial cells/ml in nasal fluid were similar in the three groups. A positive correlation between CT score, peripheral blood eosinophilia, number of eosinophils/ml and eosinophil cationic protein concentration was found in the nasal fluid of atopic children (n=48). There was an association between number of neutrophils and titers of interleukin-8 and myeloperoxidase, and between interleukin-8 and eosinophil count.

**Conclusions:** in asthmatic patients with no symptoms of sinusitis, the extensive involvement of the paranasal mucosa is associated with blood and nasal lavage eosinophilia and cellular activation. Neutrophil infiltration and activation were not related to increased involvement of the paranasal mucosa.

*J Pediatr (Rio J) 2001; 77 (4): 271-8: sinusitis, asthma, rhinitis, computed tomography, nasal lavage, interleukin-8, myeloperoxidase, eosinophil cationic protein.*

**Introduction**

Sinusitis is defined as the inflammatory process of one or more paranasal sinuses that is frequently associated with allergic rhinitis and asthma.<sup>1</sup> The literature does not present a study on the incidence of bacterial sinusitis in allergic and

nonallergic patients, nor on whether the earlier present more acute or severe disease than the latter.<sup>2</sup>

Sinusitis can coexist with, or be the cause of asthma. The exact mechanism responsible for this association, however, is still not well-understood. Moreover, the lack of uniform procedures for the diagnosis of sinusitis has allowed for conflicting results.<sup>3</sup> Allergic children with chronic respiratory symptoms have presented increased radiological alterations of the facial sinuses, from mucosal thickening to

1. Master; Pediatrics; Services of Pediatric Allergy and Immunology, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná.

2. Professor, Department of Pediatrics, Universidade Federal do Paraná.

3. Assistant Professor, Radiology, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná.



air fluid levels and opacification.<sup>4</sup> Asthmatic patients often present chronic inflammatory alterations of the paranasal mucosa, which makes the diagnosis of sinusitis more difficult in atopic patients, especially those who are asthmatic. Thus, it is important to keep in mind that not all abnormal radiological findings of facial sinuses in either X-ray or computed tomography scans (CT-scan) are an indication of bacterial infection.<sup>5,6</sup>

Coronal computed tomography is currently the optimal study for examination of paranasal sinuses. This exam allows for delineation of the osteomeatal unit and of the ethmoidal sinuses, which are important in the pathophysiology of sinusitis. CT scans also allow for determining extension of the involvement of the paranasal mucosa.<sup>7</sup>

The histology of the nasal mucosa is similar to that of lower airways. The nasal mucosa can be easily accessed, thus allowing for study of the allergic process, especially in children.<sup>8,9</sup>

Quantitative cytology of nasal secretions (QCNS) can help the investigation for rhinitis, but it is a complex, expensive, and slow procedure<sup>(10)</sup>. QCNS has been simplified and assessed for precision and accuracy, in addition to being compared to differential count in nasal scrape.<sup>11</sup>

On the one hand, due to reports of sinusitis deteriorating or causing asthma, the use of antibiotics is common in allergic patients with chronic respiratory symptoms. On the other hand, studies have increasingly shown the presence of radiological alterations of the facial sinuses in asthmatic and/or allergic rhinitis patients, with or without infectious sinusitis. These findings allow for questioning of the prolonged use of antibiotics in these patients, considering that others have reported improvement without the use of antibiotic treatment.<sup>2</sup>

Our study was carried out with children with persistent asthma and/or perennial allergic rhinitis and asymptomatic for infectious sinusitis. Our objective was to assess the relation of cellularity and inflammatory mediators in nasal washings with the severity of tomography alterations of the paranasal mucosa of these patients.

## Patients and Methods

We consecutively selected 48 atopic outpatients being followed up at the Pediatric Allergy and Immunology Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas, teaching hospital of the Universidade Federal do Paraná. All 48 patients had allergic rhinitis, and 33 out of the 48 patients had asthma associated with allergic rhinitis (all positive allergy skin test responses to the acarus *D. pteronyssinus*).

The control group included 13 nonatopic children followed up at the Neuropediatrics Service. These patients were submitted to cranial CT scan for investigation for epilepsy. This group was examined using anamnesis and physical examination for symptoms and signs of allergic rhinitis and/or asthma; moreover, these patients were selected according to negative skin test response in order to exclude atopy. We selected children with minimal age of 8 years and who cooperated with exams of pulmonary function, and CT scan of facial sinuses and of nasal washings.

The 61 patients were stratified according to diagnosis and to CT score. Group I included patients with asthma and allergic rhinitis (n=33); group II, patients with allergic rhinitis (n=15); and group III, patients who were nonatopic (n=13).

We excluded patients with history of recurrent or chronic sinusitis indicating symptoms of odynophagia, purulent nasal and postnasal secretion, nasal congestion, and productive night cough(4); with infection of upper and lower airways, respectively at 2 and 4 weeks prior to CT scan and spirometry; with presence of mechanical obstruction to rhinoscopy; with use of topic or systemic corticoids, respectively at 1 and 2 months prior to the study; and with use of antihistaminics on the week prior to the study.

We collected blood for hemogram examinations. Patients with 350 cells/mm<sup>3</sup> or more were considered cases of eosinophilia.<sup>12</sup> Spirometry was carried out with electronic spirometer (Spirosift 3000; Fukuda Denshii, Japan). The forced expiratory volume in one second (FEV1) was expressed as percent of predicted.<sup>13</sup>

During the examinations, patients presented symptoms of asthma and allergic rhinitis characterized, respectively, by recurrence of dry cough, wheezing, and/or dyspnea and by itching, sneezing, coryza, and/or nasal obstruction.<sup>14</sup> Cases of rhinitis were not treated. Asthma was treated with routine use of teophylline (5 mg/kg doses; three times a day) and of bronchodilator on demand.

We carried out coronal CT scans of the facial sinuses starting at the frontal sinus to the sphenoidal sinus (including the nasal cavity). Exams were assessed by a radiologist who was not aware of clinical status of patients. A standardized score was employed to assess the severity of involvement of the mucosa of paranasal sinuses. The areas assessed were divided into nasal cavity, osteomeatal complex, and paranasal sinuses. On the paranasal sinuses, each sinus was individually examined according to maximum thickness of the mucosa (mm); a score of 0 to 3 was used according to thickening of the mucosa. Quantitation of osteomeatal complex and nasal passage was scored 0 for absence of lesion, 1 for minimal involvement, 2 for moderate involvement, and 3 for severe involvement of the mucosa. The maximum score was 30 (21 points for facial sinuses, 6 for osteomeatal complex, and 3 for nasal passage). CT score



sum was used to group patients according to severity of lesion to the paranasal mucosa. Scores from 0 to 11 indicated limited disease and scores greater than or equal to 12 indicated severe disease.<sup>15,16</sup>

Nasal washings were obtained according to the technique described by Bascom *et al.*,<sup>10</sup> which we adapted for children. For the collection of nasal fluid, patient's heads were in extended prone position at approximately 30 degrees. After occlusion of the rhynopharynx with the soft palate, 5.5 ml of saline solution were instilled in fractional doses into each nostril. After 10 seconds, patients flexed their neck and the material was collected into a graded, conical tube; the tube was kept in ice during the collection procedure. The volume recovered was registered immediately.<sup>10,17</sup>

Homogenization of nasal fluid was carried out with vigorous shaking of the material and centrifuging at 4 degrees C (1,000 g/5 min).<sup>10</sup> Aliquots of the supernatant material were stored at -80 degrees C for determination of inflammatory mediators and cytokines. The sediment obtained was suspended in 10-ml phosphate buffer saline solution (PBS), shaken and centrifuged at 4 degrees C (1,000 g/15 min). We measured the final volume of the second sediment. A 10- $\mu$ l aliquot was used to fill the Neubauer hemocytometer counting chamber to count the total number of cells per ml (100x and 400x magnification microscope). If the sample presented a high concentration, the preparation was diluted once more for total cell count per ml using the formula below:

Total number of cells/ml = [(cell count) / (squares count)]  $\div$  [counting chamber conversion factor] x [dilution factor].

The Neubauer hemocytometer conversion factor was 10,000. The dilution factor used was the ratio final:initial volume of the sediment.<sup>18</sup>

After dilution of the sediment in PBS, cell concentration was adjusted to 500 cells/ $\mu$ l. Out of this sample, a 200- $\mu$ l aliquot was centrifuged (LABHO CT-12 Cytocentrifuge) at 600 rpm for 6 minutes for the slides. The slides were stained using May-Grunwald-Giemsa stain for differential count of 100 cells in a 400x or 1,000x magnification microscope. Slides were examined by a pathologist who had no knowledge of clinical status of patients. The pathologist carried out the examination together with one of the authors. The total count per ml of each cell type was calculated multiplying total cell count per ml by the fraction obtained in differential diagnosis.<sup>10,11,19</sup>

Competitive radioimmunoassay using iodine 125-labeled albumin (Diagnostic Products Corporation; Los Angeles, CA) was used for detecting and quantitating albumin concentration in nasal fluid. The concentration of myeloperoxidase (MPO) in nasal fluids was measured by radioimmunoassay (Pharmacia & Upjohn Diagnosis - Uppsala, Sweden). The concentration of Eosinophil cationic protein (ECP) was measured by fluorometric enzyme

immunoassay (FEIA; Pharmacia CAP System; Uppsala, Sweden). Finally, the concentration of interleukin-8 was measured by double-antibody enzyme immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN).

We employed analysis of variance (ANOVA) for assessing differences in and between groups. Mann-Whitney test was used for comparison of total and differential cell counts of mediators and cytokines in nasal washings with nonpaired groups. Correlation was assessed using Spearman's correlation coefficient. Fisher's test with Yates' correction was used to assess the differences between proportions. Significance level was considered at 5%. The statistical software employed was the STATISTICA (version 4.2).

Our study was approved by the Ethics Committee of the Hospital DAs Clínicas, Teaching Hospital of the Universidade Federal do Paraná. Informed consent was obtained from the parents or guardians of all patients in the study population.

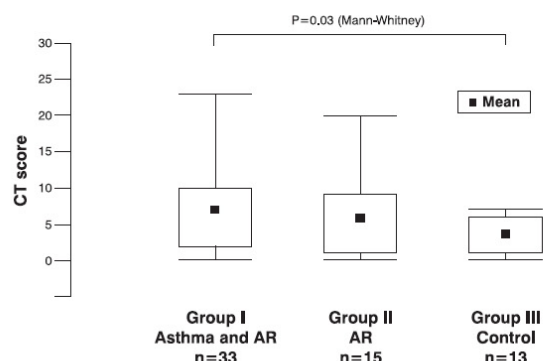
## Results

The 61 patients in our population were grouped according to diagnosis and CT scores. Group I included patients with asthma and allergic rhinitis (n=33); group II, patients with allergic rhinitis (n=15); and group III, patients who were nonatopic (n=13). The age averages and ranges of patients in groups I, II, and III were, respectively, 11.6 (9-15); 11.7 (8.8-14.5); and 11.8 (8-14) years. The female-to-male sex ratio of each group was of, respectively, 11:22; 5:10; 3:10.

Lower and upper limits of standard CT scores of facial sinuses were 0 and 30. Severe paranasal disease (CT score greater than or equal to 12) was diagnosed in 7 (21%) of patients in group I; and 2 (13%) in group II. All patients in group III presented scores less than 12 (Figure 1). The findings of anatomical variations were not associated with severity of lesions indicated by CT scores of facial sinuses.

Atopic patients presented eosinophilia, which was significantly more prevalent between asthmatic patients. We observed a positive correlation ( $r_s=0.41$ ;  $P=0.004$ ) between peripheral eosinophilia and severity of mucosal involvement indicated by CT scores (Figure 2).

In group I, the distribution of patients according to severity of asthma in the categories of mild or moderate persistent was, respectively, of 24 and 9 cases; no patient presented severe asthma. The upper and lower limits of FEV1 for group I were 61 and 107%. The average FEV1 was smaller in the group with asthma and allergic rhinitis when compared to controls. FEV1 was not different between asthmatics with CT score greater or less than 12. FEV1 was similar in the allergic rhinitis and control groups.



**Figure 1** - Box & Whisker Plot: CT score of facial sinuses according to groups

Nasal washing was carried out in all patients and the recovered nasal fluid was analyzed for total and differential cell count per ml. The volume percentage of nasal fluid recovered in all three groups was similar. We carried out analysis of inflammatory mediators on the nasal fluids of all atopic patients and in 6 out of 13 control patients.

**Table 1** - Peripheral eosinophil count and pulmonary function parameters of the three groups

Group	n	Eosinophils <sup>†</sup> (/mm <sup>3</sup> )*	FEV1 § (%) **
Asthma and AR (I)	33	686 ± 520	83
AR (II)	15	409 ± 364	89
Control (III)	13	148 ± 94	91

† Mean ± SD

§ Mean

\* Group I x Group II x Group III; P<0.05

\*\* Group I x Group III; P<0.05

The total cell count recovered from the nasal fluid of patients with asthma and allergic rhinitis was significantly greater than that of controls. There were no differences between the allergic rhinitis group and controls (Table 2). Total cellularity was greater in the subgroup of asthmatic patients with severe lesion indicated by CT scan (median=1,322 cells/ml).

Atopic patients presented prevalence of eosinophils in nasal fluid and a positive correlation between CT score and eosinophil count per ml (Figure 2). There was no correlation of CT scores of facial sinuses with other cells of the differential count, nor with total cellularity per ml of nasal fluid. The total neutrophils count per ml was similar in all three groups. The total epithelial cells count per ml was greater in the asthma and allergic rhinitis group in comparison to the allergic rhinitis group. The allergic rhinitis and control groups were similar as to the total epithelial cells count per ml (Table 2).

The total eosinophils count per ml was significantly greater in the group of asthmatics with severe involvement of the mucosa (median=912 eosinophils per ml) in comparison to the other groups, including that of asthmatics with facial sinuses CT scores less than 12 (median=309 eosinophils per ml). The total neutrophil and epithelial cell counts in nasal fluid were similar in all subgroups, independently of the severity of involvement of paranasal mucosa indicated by CT of facial sinuses.

Early analysis of inflammatory mediators and cytokines indicated differences only in level of MPO, which was greater in the control group in comparison to asthmatics. Assessment of groups according to CT scores indicated that this difference remained only in the comparison of controls and asthmatics with CT score less than 12. The level of albumin in nasal fluid was higher in asthmatics with CT scores of facial sinuses greater than 12 (median=85) in comparison to controls (median=45). We noted a wide variation in concentration of ECP in nasal fluid of our population. ECP was significantly greater in the group of asthmatics with CT scores of facial sinuses greater than 12

**Table 2** - Total and differential cell count x 10e3 in the nasal fluid of the three groups

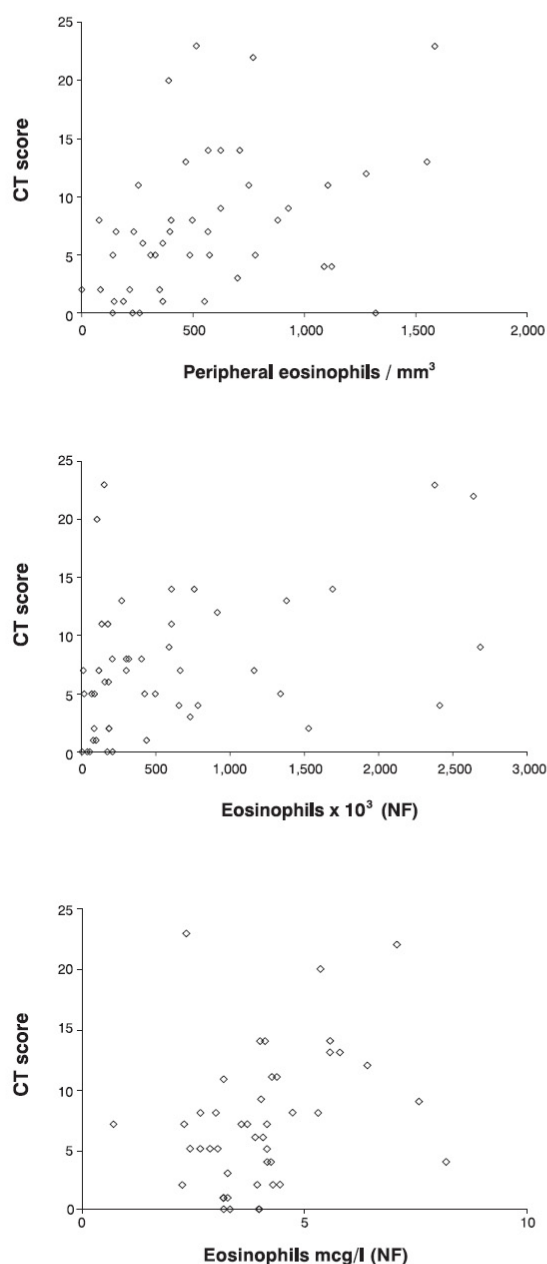
Group	n	Total cell count/ml *	Nasal fluid (Cell count x 10 <sup>3</sup> ) ‡		
			Differential cell count		
			Eosinophils/ml**	Neutrophils/ml	Epithelial cells/ml***
I Asthma and AR	33	856	423.4	92.9	137.5
II AR	15	422	177.1	92.5	55.1
III	13	390	6.1	167.3	113.5

‡ Median

\* Group I x Group III, P<0.01;

\*\* Group I x Group III, P<0.0001; Group II x Group III, P<0.001





**Figure 2** - Correlation between CT score and peripheral eosinophils, eosinophils, and ECP in nasal fluid (NF)

(median=266), but only when compared to the subgroup of patients with allergic rhinitis and CT scores less than 12. ECP was detected in nasal fluids of normal individuals, though in smaller amounts than that of the other groups (Table 3).

The levels of interleukin-8 in nasal fluid were similar in all three groups despite the severity of involvement of paranasal mucosa according to CT of facial sinuses.

CT scores of facial sinuses were associated with ECP (Figure 2). Analysis of differential cell count indicated that only the concentration of eosinophils per ml presented a direct relation with the determinations of albumin ( $RS=0.49$ ;  $P$  less than or equal to 0.001) and ECP ( $RS=0.55$ ;  $P$  less than or equal to 0.0001).

### Discussion

Rhinosinusitis are among the most frequent chronic diseases; they are commonly associated with allergic rhinitis, and high morbidity rates and treatment costs.<sup>1</sup>

Alterations in radiological findings of the facial sinuses are common in children with atopic asthma and associated allergic rhinitis. These findings are parallel to persistent symptoms of upper airways that simulate chronic sinusitis even in the absence of associated infections.

Pelikan and Pelikan-Filipek<sup>20</sup> observed an increase in mucosal edema and/or opacification in 32 out of 73 patients through radiological examination of facial sinuses before and repeatedly after allergen challenge. These authors showed the relationship between sinusitis and allergic rhinitis.<sup>20</sup>

In our study, two out of 15 patients (13%) with perennial allergic rhinitis presented severe involvement of the mucosa at CT scan of facial sinuses. Asthma and rhinitis (group I) and allergic rhinitis (group II) patients presented active rhinitis; thus, the difference between these patients was presence or not of asthma. Since group I patients presented a more severe involvement of paranasal mucosa, we believe that the variable asthma, independently of its severity, is related to greater involvement of the paranasal mucosa. This could be the indication of a more severe inflammatory response of the respiratory mucosa.

The estimated incidence of sinusitis in asthmatic patients is of 40% to 75%. Despite the fact that others have indicated that sinusitis precipitates or deteriorates asthma, the question of whether they simply coexist or are the target of the same inflammatory process in different parts of the respiratory tract still remains unanswered.<sup>1</sup>

Pfister et al. observed that computed tomography showed at least minimal mucosal thickening in any of the paranasal sinuses in 74% of the patients. Acute sinusitis was not common.<sup>5</sup>

Paranasal mucosal thickening was also reportedly frequent in the investigation of 100 asthmatic patients who presented persistent upper airway symptoms, and were

**Table 3** - Inflammatory mediators in nasal fluid of patients of the three groups

Grupo	n	Fluido nasal <sup>‡</sup>			
		Albumina (mcg/l)	ECP (mcg/l)	MPO (mcg/l)*	IL-8 (pg/ml)
I (Asthma and AR)	33	74 (10–205)	55 (2–3,614)	246 (12–612)	831 (66–2,245)
II (AR)	15	57 (6.6–402)	41 (0.02–266)	112 (12–1,368)	692 (103–4,000)
III	6	45 (12–98)	34 (5–124)	427 (195–846)	1,243 (513–2,488)

<sup>‡</sup> Median (Limits)

\* MPO: Group I x Group III, P=0.03

submitted to radiological examination of the facial sinuses. Thickening greater than 6 mm was associated with productive cough and bacterial sinusitis; this was not observed for patients with thickening less than 2 mm. The authors concluded that this is an indication of allergic sinus disease.<sup>21</sup>

Zimmerman et al. carried out study on the relation of radiological findings to severity of asthma, which included 138 children presenting from cough equivalent asthma to severe asthma. Results indicated that abnormalities occurred in 27 to 36% of patients but with lack of relation to severity of asthma.<sup>22</sup>

A study has indicated that bronchial hyperresponsiveness to methacholine reflects the severity of asthma. In that study, the hyperresponsiveness was greater in asthmatic patients with infectious sinusitis than in those without sinusitis, but it improved after treatment of sinusitis. The authors also observed that symptoms decreased with appropriate response of sinuses to clinical therapy of sinusitis.<sup>23</sup>

Our results showed that in atopic patients, mainly asthmatic patients (21%), there is a propensity to severe lesion to paranasal mucosa, but which does not result in more severe asthma or airway obstruction. CT scores of zero were found in only 2 of 33 (6%) asthmatic patients. These findings suggest that involvement of paranasal mucosa is common in asthma patients asymptomatic for infectious sinusitis without resulting in deterioration of asthma. However, our population included only patients with mild and moderate asthma, since they comprise most of the cases being followed-up at outpatient clinics.<sup>24</sup> Moreover, we excluded patients who were administered systemic corticoid for treatment of severe asthma.

The disagreement found in the literature regarding the relationship between sinusitis and asthma in children can be

attributed to failures in planning, to randomization, and to absence of control groups; moreover, there is a lack of uniform diagnostic criteria and of considering the variability of clinical presentations of asthma in children.<sup>25</sup>

Newman et al., in a study on adults with chronic sinusitis, found an association between asthma and eosinophilia in cases with severe involvement of the paranasal mucosa indicated by CT scans. Eosinophilia was the determining factor for the severity of mucosal lesion, even in nonatopic patients.<sup>16</sup>

We observed an association between severity of mucosal lesion indicated by CT scan and peripheral eosinophilia in atopic patients asymptomatic for sinusitis (with asthma and/or allergic rhinitis). This suggests that eosinophils participate in determining severity of lesions, especially in the case of asthmatic patients.

Recently, it is possible to find in the literature the concept of continuity of airways; in this sense, inflammatory processes on the upper airways can both affect the lower airways or be a consequence of lower airway inflammatory processes. This concept is based on histological findings of nasal and endobronchial biopsies of asthmatic patients that indicate extensive infiltration of paranasal tissue with eosinophils much similar to that found in asthma.<sup>26,27</sup>

The nasal mucosa is a site that is easy to access for the study of inflammatory processes. The fluid from nasal washings can reflect the intensity of the inflammatory process and provide a parallel between symptoms of the upper and lower respiratory tracts.<sup>9</sup> The simplified QCNS can be applied to clinical investigations since it quantitates cellularity of nasal mucosa. However, this test still lacks standardization, which makes it more difficult to compare study results.<sup>11</sup>



We observed that cellularity of nasal fluids could not be used to differentiate patients with higher CT scores. We found percentages of neutrophilia in the nasal fluids of controls, but not absolute neutrophilia. However, these values of neutrophilia were lower than those observed in virus-induced asthma exacerbations.<sup>11</sup> The presence of neutrophils in nasal fluids can be used to diagnose infectious rhinosinusitis, but neutrophilia can also be found in nasal secretion of normal individuals.<sup>28</sup>

Eosinophilia of nasal secretion helped to differentiate asthmatic patients with more severe involvement of the mucosa indicated by CT scan even from the subgroup of patients with less severe lesions.

Noah et al. did not observe a difference in the level of eosinophilia in nasal fluid when comparing allergic, nonasthmatic patients with allergic, asthmatic patients who were all asymptomatic during examination.<sup>9</sup>

Others have observed that inflammatory and structural cells are involved in the production of cytokines and inflammatory mediators in the respiratory mucosa of allergic and asthmatic patients; these cells maintain chronic inflammation and airway hyperresponsiveness.<sup>29,30</sup>

The concentration of albumin in nasal fluid is one of the parameters for vascular permeability.<sup>9</sup> In our population, the nasal fluid concentrations of albumin were greater in the group of asthma and allergic rhinitis patients (Group I) with severe lesion indicated by CT scan. Only the eosinophils count was proportional to the concentration of albumin, which may reflect a relation between increase in vascular permeability and influx of inflammatory cells, chiefly of eosinophils.

Noah et al. observed higher IL-8 levels in nasal fluid of asthmatic patients in comparison to that of allergic, nonasthmatic and of nonatopic patients (all asymptomatic during examination).<sup>9</sup> Moreover, increased IL-8 levels have been observed in nasal aspirates from children during the virus-induced asthma exacerbations, independently of atopy.<sup>31</sup>

In addition to the differences in methods and population of these studies, our patients were being administered oral theophylline (low dosage) and bronchodilator on demand. The use of oral theophylline may have affected the assessment of mediators in nasal fluids. Naclerio et al. showed that theophylline reduces the release of histamine and other mediators, which can be a result of the effect of xanthines on the activation of mast cells/basophils.<sup>32</sup>

Eosinophilic infiltration of the respiratory mucosa is characteristic of allergic rhinitis and asthma; and so is the release of cytotoxic proteins derived from their granules, such as ECP and major basic protein (MBP).<sup>33</sup> Lesions to the respiratory epithelium in asthmatic patients are proportional to eosinophilic infiltration and release of ECP and MBP.<sup>34</sup> Asthmatic patients present significantly higher

levels of IL-8 and ECP in nasal washings in comparison to atopic, nonasthmatic patients and to normal individuals.<sup>9</sup>

We observed a positive correlation between CT scores, eosinophils count, and concentration of ECP in nasal fluids. In this sense, more severe involvement of the mucosa indicated by CT scans of facial sinuses was associated with both eosinophilia and activation of eosinophils in nasal fluids; this suggests that lesion to the paranasal mucosa is secondary to eosinophilic inflammation.

Our data indicate that asthmatic patients asymptomatic for sinusitis present more severe involvement of the paranasal mucosa, which may suggest that sinusitis and asthma are related to the same inflammatory process at different levels of the respiratory tract.

Though our patients did not present clinical status of sinusitis, we cannot confirm that they did not have infection of the paranasal sinuses. However, the radiological diagnosis of sinusitis in allergic patients should not be used for indication of prolonged treatment with antibiotics. In this sense, it is important to consider that the involvement of the mucosa of the paranasal sinuses can occur together with allergic, inflammatory response of the respiratory airways instead of with an infectious process. The practical implications of our results involve the need for finding an adequate treatment for respiratory allergies in atopic patients before the investigation through imaging for infectious sinusitis, and before the indication of prolonged use of antibiotics in these patients.

## Acknowledgments

To professor Álvaro Cruz for the orientation in the technique of quantitative cytology of nasal secretions and to professor Gilberto Sampaio for the help with the assessment of the slides.

## References

1. Spector SL, Bernstein IL, Li JT, Berger WE, Kaliner MA, Schuller DE, et al. Parameters for the diagnosis and management of sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:S117-S144.
2. Dohman AW, Hemstreet MP, Odrezin GT, Bartolucci AA. Subacute sinusitis: Are antimicrobials necessary? *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:1015-23.
3. Borts MR, Slavin RG. Sinusitis and asthma. In: *Sinusitis Pathophysiology and Treatment*. New York: Marcel Dekker; 1994. p.159-74.
4. Rachelefsky GS, Goldberg M, Katz RM, Boris G, Gyepes MT, Shapiro MJ, et al. Sinus disease in children with respiratory allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1978; 61:310-14.



5. Pfister R, Lütolf FM, Schapowal A, Glatte B, Schmitz M, Menz G. Screening for sinus disease in patients with asthma: A computed tomography-controlled comparison of A-mode ultrasonography and standard radiography. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94:804-9.
6. Kuhn JP. Imaging of the paranasal sinuses: Current status. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:1, part 1:6-8.
7. Zinreich J. Imaging of inflammatory sinus disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 1994; 14:17-29.
8. Raphael GD, Druce HM, Baraniuk JN, Kaliner M. Pathophysiology of rhinitis – Assessment of the sources of protein in methacholine-induced nasal secretions. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:413-20.
9. Noah TL, Henderson FW, Henry MM, Peden DB, Devlin RB. Nasal lavage cytokines in normal, allergic, and asthmatic school-age children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1290-6.
10. Bascom R, Pipkorn U, Lichtenstein LM, Naclerio RM. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:406-12.
11. Cruz AA. Citologia quantitativa do lavado nasal: desenvolvimento de uma técnica simplificada e sua validação para o diagnóstico de rinite [thesis]. Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Pós-graduação em Medicina Interna; 1996.p.60-117.
12. Rothenberg ME. Mechanisms of disease – Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338:1592-600.
13. American Thoracic Society. Standardization of spirometry. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1107-36.
14. National Asthma Education and prevention program committee. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Institute of Health, Bethesda, MD; 1997.p.47-61.
15. Zinreich SJ. Rhinosinusitis: Radiologic diagnosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 117:S27-S34.
16. Newman LJ, Platts-Mills TAE, Phillips CD, Hazen KC, Gross CW. Chronic sinusitis: Relationship of computed tomographic findings to allergy, asthma, and eosinophilia. *JAMA* 1994; 271:363-7.
17. Naclerio RM, Meier HL, Sobotka AK, Adkinson NF, Meyers DA, Norman PS, Lichtenstein LM. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:597-602.
18. Mahy BWJ, Kangro HO. Quantifying by cell counts. In: *Virology methods manual*. London: Academic Press; 1996. p.13-15.
19. Meltzer EO, Jalowayski AA. Nasal cytology in clinical practice. *Am J Rhynology* 1988; 2:1-8.
20. Pelikan Z, Pelikan-Filipek M. Role of nasal allergy in chronic maxillary sinusitis. Diagnostic value of nasal challenge with allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86:484-91.
21. Rubin AS, Hetzel JL, Irion K. Radiologia das vias aéreas superiores em pacientes asmáticos. *J Pneumol* 1994; 20:1-5.
22. Zimmerman B, Stringer D, Feanny S, et al. Prevalence of abnormalities found by sinus x-rays in childhood asthma: Lack of relation to severity of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80:268-73.
23. Oliveira CAA, Solé D, Naspitz CK, Rachelefsky G. Improvement of bronchial hyperresponsiveness in asthmatic children treated for concomitant sinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79:70-4.
24. Trippia SMG, Rosario NR, Ferrari FP. Aspectos clínicos da asma na criança: análise de 1009 pacientes de um ambulatório especializado. *Rev Bras Alerg Immunopatol* 1998; 21:75-82.
25. Kaliner MA, Osguthorpe D, Fireman P, et al. Sinusitis: Bench to bedside. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:S829-S847.
26. Harlin BL, Ansel DG, Lane SR. A clinical and pathologic study of chronic sinusitis: the role of the eosinophil. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:867-75.
27. Poulter LW, Norris A, Power C, Condez A, Burnes H, Schmekel, et al. T cell dominated inflammatory in the bronchioles of asymptomatic asthmatics are also present in the nasal mucosa. *Postgrad Med J* 1991; 67:747-53.
28. Malmberg H. Symptoms of chronic and allergic rhinitis and occurrence of nasal secretion granulocytes in university students, school children and infants. *Allergy* 1979; 34:389-94.
29. Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:1001-9.
30. Bradding P, Feather IH, Wilson S, Bardin PG, Heusser CH, Holgate ST, et al. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. *J Immunol* 1993; 151:3853-65.
31. Teran LM, Johnston SL, Schroder J, Church MK, Holgate ST. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1362-66.
32. Naclerio RM, Bartenfelder D, Proud D, Togias AG, Meyers DA, Sobotka AK, et al. Theophylline reduces histamine release during pollen-induced rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78:874-6.
33. Cook PR, Nishioka GJ. Allergic rhinosinusitis in the pediatric population. *Otolaryngol Clin of North Am* 1996; 29:39-55.
34. Lim MC, Taylor RM, Naclerio RM. The histology of allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:136-44.

## Correspondence:

Loreni C.S. Kovalhuk

Rua Júlia Wanderley, 657

CEP 80430-030 – Curitiba, PR, Brazil

E-mail: kovalhuk@softone.com.br

**PRODUÇÃO ACADÊMICA - WISC 2014 Abstract Acceptance Notification****WISC 2014 Abstract Acceptance Notification**

wao@confex.com (wao@confex.com)

22/09/2014

Para: lorenikovalhuk@hotmail.com

De: **wao@confex.com**

Enviada:segunda-feira, 22 de setembro de 2014 18:48:47

Para: lorenikovalhuk@hotmail.com

"Histopathology of nasal mucosa and inflammatory changes in nasal wash of symptomatic rhinitis patients"

Thank you very much for submitting the above-referenced abstract for presentation at the 2014 WAO International Conference!

Thank you for submitting the above-referenced abstract for presentation at the WAO International Scientific Conference 2014 and the XLI Annual Congress of the Brazilian Association of Allergy and Immunology (ASBAI) to be held on 6-9 December 2014 in Rio de Janeiro, Brazil.

On behalf of the WISC 2014 Scientific Program Committee, I am pleased to inform you that this abstract has been accepted for poster presentation during the following Poster Session:

POSTER SESSION: Immunotherapy, Rhinitis, Sinusitis, Ocular Diseases and Cough

Monday, 8 December 2014 *Scheduled Session Date*

2:30 PM *Scheduled Start Time of the Session*

**Your Abstract Number will be provided shortly.**

# PRODUÇÃO ACADÊMICA – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF OTORHINOLARYNGOLOGY

+Model

ARTICLE IN PRESS

Braz J Otorhinolaryngol. 2019;xxx(xx):xxx-xxx



Brazilian Journal of  
OTORHINOLARYNGOLOGY

[www.bjorl.org](http://www.bjorl.org)


## ORIGINAL ARTICLE

### Nasal lavage cytology and mucosal histopathological alterations in patients with rhinitis<sup>☆</sup>

Loreni C.S. Kovalhuk<sup>a</sup>, Ederaldo Queiroz Telles<sup>b</sup>, Monica Nunes Lima<sup>ib</sup>,  
Nelson A. Rosario Filho<sup>ib a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Paraná (UFPR), Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

Received 15 August 2018; accepted 8 January 2019

#### KEYWORDS

Allergic rhinitis;  
Eosinophil;  
Basement membrane;  
Airway remodeling

#### Abstract

**Introduction:** The extent of epithelial lesion in allergic and non-allergic rhinitis and its association with inflammatory changes in nasal lavage has not been clarified.

**Objective:** To verify the association between the inflammatory cells in the nasal lavage, epithelial lesion extent and basement membrane thickness, in the nasal mucosa of patients with rhinitis; to determine the cutoff point of the percentage of eosinophils in the nasal lavage associated with the atopic patients.

**Methods:** Patients with rhinitis and indication for septoplasty and (or) turbinectomy for turbinate hypertrophy were selected, and were submitted to allergy skin tests, nasal lavage with measurement of albumin and interleukin-8 levels, total and differential counting of cells, and mucosal histopathological analysis to determine the extent of epithelial lesion, and degree of basement membrane thickening.

**Results:** Fifty-six patients with a median age of 24.5 years and a diagnosis of allergic rhinitis ( $n = 36$ ) and non-allergic rhinitis ( $n = 20$ ) were studied. In atopic subjects, allergy skin tests were positive for *Dermatophagoides pteronyssinus* in 35 (97.0%) and *Lolium perenne* in 18 (50.0%). Atopic subjects showed a higher clinical score index of rhinitis compared to non-atopic ones. The total count of cells, neutrophils, and levels of albumin and IL-8 were not different in the nasal lavage of atopic and non-atopic subjects. The cutoff point for eosinophil count in nasal fluid for the distinction between allergic rhinitis and non-allergic rhinitis

<sup>☆</sup> Please cite this article as: Kovalhuk LC, Telles EQ, Lima MN, Filho NA. Nasal lavage cytology and mucosal histopathological alterations in patients with rhinitis. Braz J Otorhinolaryngol. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.01.005>

\* Corresponding author.

E-mail: [nelson.rosario@ufpr.br](mailto:nelson.rosario@ufpr.br) (N.A. Rosario Filho).

Peer Review under the responsibility of Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

<https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.01.005>

1808-8694/© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**PALAVRAS-CHAVE**

Rinite alérgica;  
Eosinófilo;  
Membrana basal;  
Remodelamento da  
via aérea

was 4%. Some degree of epithelial lesion was more frequent in allergic rhinitis (94%) than in non-allergic rhinitis (65%) patients. In the presence of basement membrane thickness, as a marker of remodeling, there was no difference in the nasal lavage of patients with allergic rhinitis and non-allergic rhinitis.

**Conclusion:** In this series, 4% was the cutoff point for the number of eosinophils in the nasal lavage, for atopy differentiation. Upper airway remodeling assessed by basement membrane thickness showed similar inflammatory cell infiltrate in the nasal lavage, regardless of the presence of atopy.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### Citologia do lavado nasal e alterações histopatológicas na mucosa nasal de pacientes com rinite

**Resumo**

**Introdução:** A extensão da lesão epitelial na rinite alérgica e não alérgica e sua associação com alterações inflamatórias no lavado nasal, ainda não estão esclarecidas.

**Objetivo:** Verificar a relação entre o processo inflamatório no lavado nasal, extensão da lesão epitelial e espessamento da membrana basal na mucosa nasal de pacientes com rinite; determinar o ponto de corte do percentual de eosinófilos no lavado nasal associado à presença de atopia.

**Método:** Foram selecionados pacientes com rinite e indicação de septoplastia e (ou) turbinectomia por hipertrofia de conchas nasais, os quais foram submetidos aos testes cutâneos alérgicos, lavado nasal com determinação das concentrações de albumina, interleucina-8 (IL-8), contagem total e diferencial de células, análise da extensão da lesão epitelial, e grau de espessamento da membrana basal por meio de histopatologia da mucosa.

**Resultados:** Foram estudados 56 pacientes, mediana de idade de 24,5 anos com diagnóstico de rinite alérgica (n=36) e rinite não alérgica (n=20). Nos atópicos os testes cutâneos alérgicos foram positivos para *D. pteronyssinus* em 35 (97,0%) e *L. perenne* em 18 (50,0%). Atópicos apresentaram maior índice de escore clínico para rinite em comparação a não atópicos. A contagem total de células, neutrófilos e níveis de albumina e IL-8, não foi diferente entre o lavado nasal de atópicos e não atópicos. O ponto de corte da contagem de eosinófilos no fluido nasal para a distinção de rinite alérgica e rinite não alérgica foi de 4%. Algum grau de lesão epitelial foi mais frequente em pacientes com rinite alérgica (94%) do que em pacientes com rinite não alérgica (65%). Na presença de espessamento da membrana basal, como marcador de remodelamento, não houve diferença no lavado nasal entre pacientes com rinite alérgica e não alérgica.

**Conclusão:** Nesta casuística, 4% foi o ponto de corte do número de eosinófilos no lavado nasal, para diferenciação de atopia. Remodelamento da via aérea superior pelo espessamento da membrana basal, revelou infiltrado semelhante de células inflamatórias no lavado nasal, independentemente da presença de atopia.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Introduction**

Rhinitis is a chronic, prevalent disease with a complex integration between multiple genetic and environmental factors, interconnected by mechanisms associated or not with IgE. The association with other allergic diseases and phenotypes related to multiple allergen sensitization influences the intensity, frequency and persistence of symptoms.<sup>1</sup> The chronic inflammatory process in the respiratory mucosa can lead to structural alterations with airway

remodeling, well characterized in asthmatic patients,<sup>2-4</sup> but to a lesser extent in those with rhinitis.<sup>5-11</sup> All inflammatory diseases result in remodeling, which can progress to a normal or pathological reconstruction process.<sup>4</sup> In rhinitis, it is characterized by increased thickness and epithelial detachment and pseudofibrosis of the basement membrane.<sup>10</sup>

The inflammatory reaction and the remodeling of the nasal turbinate mucosa results in turbinate edema and (or) hypertrophy, of which clinical consequence is nasal obstruction.<sup>9,12</sup> Additionally, the variations in the

engorgement of the complex arterial vasculature and of cavernous venous sinusoids also contribute to severe nasal obstruction.<sup>3,13</sup> An increase in the number of eosinophils in the nasal mucosa is the parameter that shows the best correlation with the nasal obstruction symptom.<sup>12</sup>

The extent of the epithelial lesion in the different types of rhinitis and the correlation with inflammatory cells and mediators is yet to be clarified. The presence of eosinophils is associated with loss of epithelial integrity in patients with allergic or non-allergic rhinitis.<sup>14</sup> However, there are disagreements regarding the cutoff point for the number of eosinophils considered high in nasal secretion samples, since the nasal secretion collection procedure can interfere with the recovered cellularity.<sup>15–17</sup> The nasal mucosa, due to the easily obtained samples, allows the study of cell alterations during the allergic reaction.<sup>15</sup> Nasal lavage is a relatively noninvasive and easy to perform technique for the quantitative measurement of cell distribution and inflammatory mediators.<sup>3,18–20</sup> The simultaneous analysis of the cell infiltrate and the degree of cell activation of nasal secretion and nasal mucosa biopsy samples shows differences between the two compartments.<sup>21</sup> Thus, the study of the inflammatory process in samples simultaneously obtained by nasal lavage (NL) and from the nasal mucosa may help to understand the mechanisms involved in allergic or non-allergic nasal inflammatory reaction.

The aim of this study was to evaluate the association between the inflammatory process in the nasal cavity lumen and the extent of the nasal mucosa lesion in atopic and nonatopic patients with rhinitis.

## Methods

Patients with allergic or nonallergic obstructive rhinitis, with surgical indication for septal deviation correction and (or) turbinectomy to alleviate nasal obstruction, were selected at the Otorhinolaryngology Service of Hospital de Clínicas of Universidade Federal do Paraná. Patients with a history of upper and lower airway infection, respectively, at 2 and 4 weeks prior to clinical evaluation were excluded; in addition to patients with a history of recent use of medications such as systemic and/or nasal topical corticosteroids, disodium cromoglycate and oral and/or nasal topical antihistamines.

The clinical diagnosis and rhinitis severity classification were attained using a symptom-adjusted (pruritus sneezing, nasal obstruction, nasal secretion/sniffing, post-nasal secretion/snorting) and sign-adjusted score (mucosa color and turbinate volume increase, aspect and volume of nasal secretion, presence of alterations at the oroscopy), graded on a scale going from 0 to 3 (absent, mild, moderate and severe), with a maximum score of 24.<sup>3,22,23</sup>

The patients underwent skin prick tests,<sup>3,24</sup> using the extracts of the most relevant allergens in the city of Curitiba, state of Paraná, Brazil,<sup>25–27</sup> such as *Der-matophagoides pteronyssinus* 5.000 BAU (bioequivalent allergen unit)/mL and *Lolium perenne* (10.000 BAU/mL), obtained from Hollister-Stier®, Spokane, USA.

The test was considered positive if the mean diameter of the papule was  $\geq 3$  mm with an erythema halo, in relation to the negative control.<sup>3,24</sup>

The patients were submitted to nasal instillation of 5 mL of isotonic saline solution (0.9%) in both nasal cavities to obtain NL fluid,<sup>19–21,28</sup> which was homogenized by shaking and centrifuged to obtain the cell pellet (1000 rpm/5 min) in a refrigerated centrifuge, so that only 0.01% of the cells remain in the supernatant.<sup>18</sup>

The supernatant was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for the measurement of mediators. The albumin concentration in the nasal lavage sample was determined by a turbidimetric immunoassay (Microalbumin MULTIGENT – Abbott Laboratories of Brazil Ltda®, detection limits of 1–500  $\mu\text{g/mL}$ ); the level of interleukin-8 (IL-8) was measured by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA MAX™ Set Deluxe – Biolegend®, San Diego, California, detection limits of 31.2–2000 pg/mL).

The nasal cytology analysis of the initially obtained pellet (cell pellet) allowed the determination of the total number of cells/mL, inflammatory and epithelial cell counts; an aliquot was cytocentrifuged (LABHO® CT-12 Cytocentrifuge) for the preparation of slides that were stained by the May–Grünwald–Giemsa method for differential counting of eosinophils, neutrophils and epithelial cells.<sup>18–20,29</sup>

The histopathological analysis of mucosa samples from the inferior nasal turbinates, obtained by partial turbinectomy procedure of the inferior nasal turbinate<sup>30</sup> or by mucosal biopsy of the antero-inferior tip of the inferior turbinates, was evaluated by light microscopy.<sup>21</sup>

The anterior portion of the inferior turbinate, more exposed to airflow and to the greater impact of aeroallergens and irritants, is more representative for the evaluation of the nasal mucosa inflammatory process<sup>31</sup> if the largest amount of tissue and mucus is collected to minimize damage to the sample.<sup>30,31</sup> The sample was fixed in formaldehyde and the tissue block was paraffin-embedded for later cutting and slide preparation.<sup>8,32</sup> The stains used were: Hematoxylin-Eosin (HE) to identify leukocytes, Periodic Acid-Schiff (PAS) to help identify goblet cells and trichrome of Gomori to help identify and measure the subepithelial collagen thickness, according to the routine of the Anatomopathological Service of Hospital de Clínicas-UFPR.

The areas of epithelium preferentially covered with mucus were evaluated, excluding fields with evidence of iatrogenic detachment of the epithelium and presence of extravasated red blood cells. Aiming to avoid false results caused by the cut tangency, the image and position of the cell nuclei were evaluated.<sup>33</sup>

The staging of the Epithelial Lesion (EL) and the degree of basement membrane thickening were based on the score proposed by Ponikau et al.<sup>32</sup> The epithelial lesion degree staging ranged from 0 to 3 (0: intact epithelium, 1: absence of ciliated cells, 2: erosion of the upper layer of cells with intact basement cell layer, 3: complete epithelium erosion), whereas the staging of the basement membrane thickening ranged from 0 to 2 (0: basement membrane not visualized; 1: visible basement membrane with thickness  $\leq 20 \mu\text{m}$ , 2: visible basement membrane with thickness  $> 20 \mu\text{m}$ ).<sup>32</sup>

At the statistical analysis, the estimate of the difference of asymmetric distribution variables was performed by a non-parametric test (Mann–Whitney), whereas categorical variables were compared by Fisher's exact test and Pearson's Chi-square test. A minimum significance level of 5% and



**Table 1** Total and differential cell count, albumin and IL-8 levels in nasal lavage of atopic and non-atopic subjects.

Nasal lavage	Atopic (n=36)	Non-atopic (n=20)	p
Total cellularity	127,000 ( $10 \times 10^3$ – $6.134 \times 10^3$ )	128,000 ( $24 \times 10^3$ – $682 \times 10^3$ )	0.90
Epithelial cells (%)	48 (8–98)	76 (10–100)	0.07
Eosinophils (%)	3 (0–66)	1 (0–21)	<0.01
Neutrophils (%)	41.5 (0–87)	17.5 (0–83)	0.24
Mononuclear cells (%)	1 (0–12)	1 (0–7)	0.96
Albumin ( $\mu\text{g/mL}$ )	16 (5–338)	16.5 (5–105)	0.67
IL-8 ( $\text{pg/mL}$ )	80 (30–1300)	81.5 (30–604)	0.45

Median (limits); Mann–Whitney test.

a minimum test power of 90% were considered for all tests. A receiver operating curve (ROC) was constructed to estimate the cutoff point with greater sensitivity and specificity. Univariate logistic regression was performed to estimate the probability of atopy according to the eosinophil count.

This study was submitted to and approved by the Human Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas of Universidade Federal do Paraná (UFPR), registry number 755.174/2003-11.

## Results

A total of 56 patient samples were analyzed, grouped according to the presence of atopy. Allergy skin tests were negative in 20/56 (36.0%) and positive in 36/56 (64.0%). Among the atopic subjects, the skin prick test was positive for *D. pteronyssinus* in 35/36 (97.0%) and/or for *L. perenne* in 18/36 (50.0%). The test was exclusively positive for *D. pteronyssinus* in 18/36 (50%) and for *L. perenne* in only 1/36 (3%).

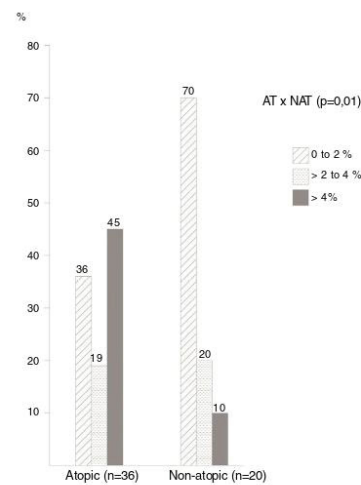
The median age was 24.5 years (14–58 years), with equal distribution by gender. The total symptom score was higher in atopic subjects (9 [1–18]) than in nonatopic ones (6.5 [0–12]) ( $p=0.01$ ).

Atopic subjects tended to show a higher frequency of pruritus and sneezing of moderate to severe intensity (47.2%), although at the limit of significance ( $p=0.05$ ). The frequency of the moderate to severe nasal obstruction symptom, present in 25/36 (69.0%) of atopic subjects, was comparable to nonatopic ones ( $p=0.16$ ).

Total and differential cell counts, as well as albumin and IL-8 levels, are shown in Table 1. The total number of NL cells and the differential count of epithelial, neutrophil and mononuclear cells were equally distributed between atopic and nonatopic subjects. Only the percentage of eosinophils was higher among atopic ones ( $p<0.01$ ).

The frequency of cases by ranges of percentage of eosinophils in the NL (Fig. 1) showed that most non-atopic subjects were concentrated within the range of 0%–2%, 14/20 (70%) of the cases in relation to 13/36 (36%) of the atopic ones ( $p=0.01$ ). On the other hand, the frequency of cases with eosinophil counts > 4% among atopic subjects was higher, observed in 16/36 (45.0%) of these patients, compared to only 2 (10%) of non-atopic ones.

The cutoff point with the highest sensitivity and specificity indexes was 4% of eosinophils in the NL, which differentiated atopic from non-atopic subjects; with this



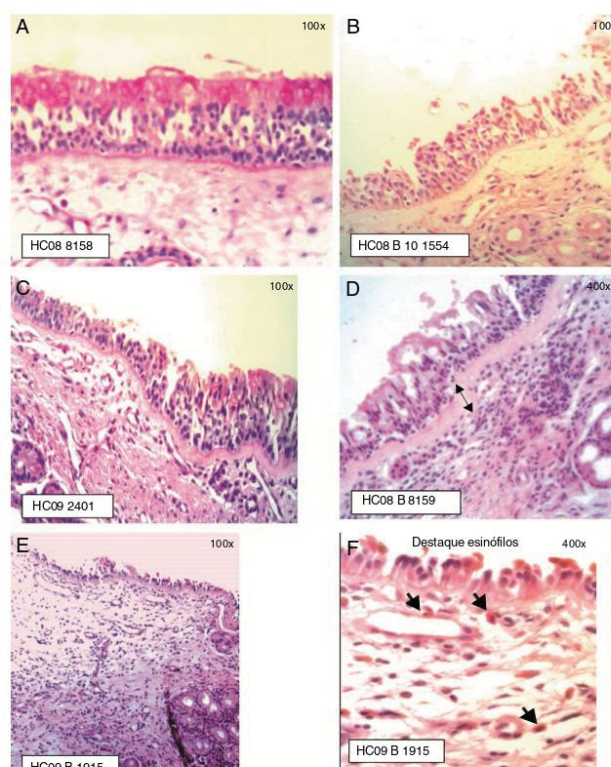
**Figure 1** Frequency of cases distributed by percentage ranges of eosinophil numbers in nasal lavage. Chi-square test with linear trends ( $p=0.01$ ).

criterion the sensitivity was 44% and the specificity was 90%. Also with a 4% cutoff, the probability of atopy was 80% ( $p<0.001$ ), increasing to 100% with a 10% eosinophil count.

The ciliated columnar pseudostratified epithelium was observed in most samples (Fig. 2). In some samples, the presence in some areas of dysplastic epithelium ( $n=1$ ), transitional to non-keratinized squamous type ( $n=7$ ) was observed. The infiltrate in the chorion/lamina propria was predominantly of the mononuclear, lymphoplasmacytic type.

The presence of epithelial lesion and basement membrane thickening are shown in Fig. 2.

Among the atopic subjects, the prevalence of epithelial lesion was 94.4% and the epithelial lesion prevalence rate was 1.4 times higher ( $p<0.01$ ). The prevalence of basement membrane lesion was 67.0%, indicating, in the atopic subjects, the non-significant chance of having some degree of basement membrane thickening 1.2-fold higher in relation to non-atopic ones ( $p=0.40$ ).



**Figure 2** Staging of Epithelial Lesion (EL) and BM thickening: (A) EL grade 0 (intact epithelium) and BM 0 (not visualized), PAS staining; (B) EL grade 1 (absence of ciliated cells) and BM 0 (not visualized), HE staining; (C) EL grade 1 (absence of ciliated cells) and BM 1 (visible BM, thickness  $\leq 20 \mu\text{m}$ ), PAS staining; (D) EL grade 1 (absence of ciliated cells) and BM 2 (visible BM, thickness  $> 20 \mu\text{m}$ ), HE staining; (E) EL grade 2 (epithelial erosion, intact basement cell layer) and BM 1 (BM  $\leq 20 \mu\text{m}$ ); (F) Eosinophil infiltration is highlighted, HE staining.

The association between the inflammatory process of the nasal cavity lumen (nasal lavage) and the nasal mucosa (histopathological analysis) showed that regardless of the atopy, in the presence of some degree of epithelial lesion, the total cell count of NL ( $p=0.18$ ); of eosinophils ( $p=0.17$ ) and neutrophils ( $p=0.75$ ); levels of albumin ( $p=0.50$ ) and IL-8 was similar ( $p=0.09$ ) (Figs. 3 and 4). However, only two atopic subjects did not have histopathological epithelial lesion. On the other hand, there was no difference in cellularity and mediators in non-atopic individuals with or without epithelial lesion. Therefore, in the study sample, the presence of epithelial lesion was not associated with changes in the NL.

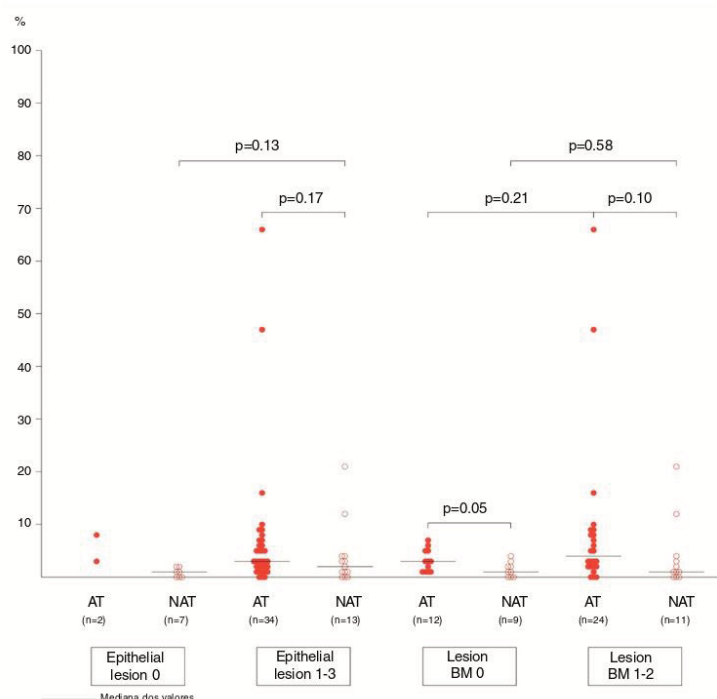
The difference in eosinophil count in the NL of atopic and non-atopic subjects, without BMT, was borderline ( $p=0.05$ ). In the presence of BMT, there were no differences in the subgroups of patients regarding the number of eosinophils in the NL. On the other hand, the BMT was associated with an increase of neutrophils in the nonatopic (NAT) subjects' NL ( $p<0.01$ ). The number of neutrophils in the NL of atopic

(AT) subjects without BMT was higher than in the NAT ones ( $p=0.04$ ). Analysis of the other NL parameters did not show significant differences in the presence of BMT (Figs. 3 and 4).

## Discussion

Rhinitis is the consequence of an allergic and non-allergic nasal mucosa inflammatory process, associated with an accumulation of inflammatory cells in the nasal cavity lumen and structural changes in the nasal mucosa. Quantifying the extent and degree of epithelial lesion, as well as the association with different cell types in the nasal mucosa in the different types of rhinitis may help in the assessment of nasal mucosa remodeling.

Studies on the occurrence and extent of remodeling in rhinitis are conflicting, because the nasal mucosa is more exposed to external stimuli, resulting in some degree of adaptive inflammatory process or due to the different remodeling criteria used in the studies.<sup>3,5,9,10,14,15,31-33</sup> Nasal



**Figure 3** Eosinophils (%) in nasal lavage of atopic and non-atopic subjects according to epithelial lesions and basement membrane thickening. –, median values (limits); Mann-Whitney test.

obstruction is one of the most common and uncomfortable symptoms of rhinitis,<sup>34</sup> and it is an important complaint in this group of patients, whether allergic or non-allergic ones. However, cases were selected at the Otorhinolaryngology outpatient clinic due to the surgical indication of septal deviation correction and/or turbinectomy due to turbinate hypertrophy, which are anatomical changes that also contribute to nasal obstruction.

The total score of the rhinitis score was higher in the atopic patients and, for atopy investigation, the extracts used in the skin prick test were selected according to the most relevant regional aeroallergens,<sup>25–27</sup> with a sensitization frequency of 97% for *D. pteronyssinus* and 50% for *L. perenne*. Nasal provocation tests with allergens could circumvent the bias of including patients with local allergic rhinitis or sensitized to other allergens in addition to house dust mites and grass pollen in the non-atopic group.<sup>35</sup>

In this study, the six patients sensitized to pollen were also sensitized to *D. pteronyssinus* and their rhinitis score was not different in relation to the other atopic subjects.

The inflammatory process evaluation of the nasal mucosa, through nasal lavage and analysis by quantitative cytology of the nasal lavage, allows the assessment of the cell infiltrate and of mediators,<sup>3,18–20</sup> with the collection being more representative when carried out in both

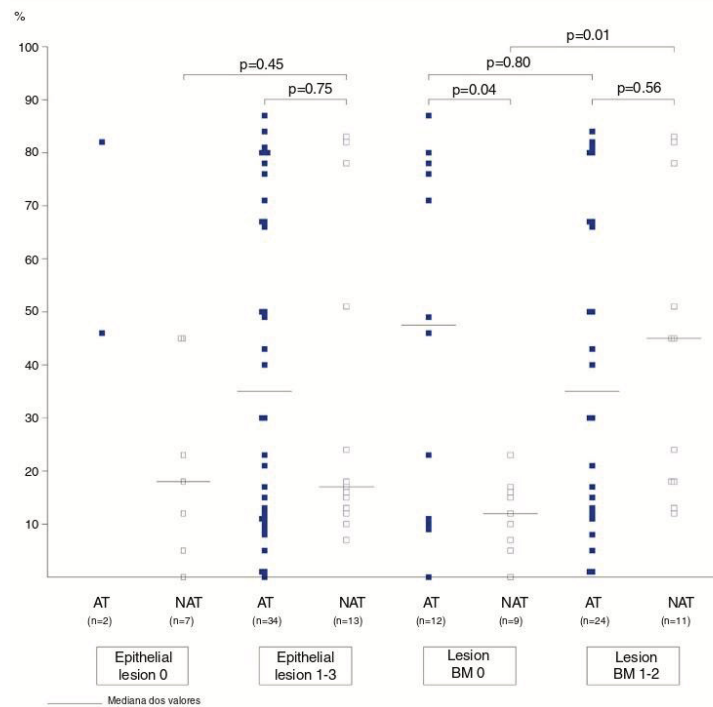
nostrils,<sup>15</sup> which is why samples were collected from both nostrils in the present study.

The cells recovered by the nasal lavage are derived from epithelial desquamation and increased vascular permeability of the epithelium, which allows the passage of plasma proteins and inflammatory cells into the nasal cavity lumen.<sup>15</sup>

In this series, IL-4, IL-5 and IFN- $\gamma$  levels were undetectable, possibly because the amounts of these mediators in samples collected without the allergenic stimulus of the nasal provocation test were labile and minimal. However, IL-4, IL-5 and IL-13 levels may be elevated in the nasal secretion of patients with persistent severe allergic rhinitis.<sup>36</sup>

The wide distribution limit of IL-8 in atopic and non-atopic NL samples may have masked any difference between the groups. This study showed no correlation between albumin levels and percentage of nasal lavage eosinophils in both groups of patients with rhinitis. This association is described in nasal provocation tests with allergens, where the increase of vascular permeability and the inflammatory cell influx is significantly higher,<sup>37,38</sup> as well as in patients with allergic rhinitis and asthma, who also show extensive involvement by computed tomography assessment of the paranasal sinuses.<sup>20</sup>





**Figure 4** Neutrophils (%) in the nasal lavage of atopic and non-atopic subjects according to epithelial lesions and basement membrane thickening. –, median values (limits); Mann-Whitney test.

Cellular infiltration in the nasal cavity lumen, reflecting epithelial desquamation and increased mucosal permeability, was similar in this group of patients with allergic or non-allergic rhinitis; only the number of eosinophils in the NL differentiated the group of atopic subjects.

The increase in the number of nasal eosinophils show a better correlation with the nasal obstruction symptom in patients with persistent allergic rhinitis.<sup>12</sup> In the study cases with moderate to severe nasal obstruction, the proportion of eosinophils in the nasal lavage was higher in the atopic group. Eosinophil infiltration is more evident after nasal provocation tests with allergens,<sup>18,38</sup> but there is a disagreement regarding the cutoff point of the number of eosinophils that is considered high in nasal secretion samples.

The difficulty in comparing study results is due to the different material collection methods, either by scraping, blown secretion and different techniques of nasal lavage, as well as several methods of staining and criteria for nasal eosinophil quantification.<sup>15–17</sup> In samples from the quantitative nasal lavage cytology, the 5% eosinophil cutoff resulted in an accuracy of 82% (sensitivity 80% and specificity 83%) in the diagnosis of perennial allergic rhinitis.<sup>19</sup>

In adults, nasal fluid eosinophil count was 6% in patients with allergic rhinitis and 2% in those with non-allergic rhinitis, and the best cutoff point was established as being 4%.<sup>39</sup>

In the present study, considering the 4% eosinophil cutoff point, the probability of atopy was 80% and increased to 100% with a 10% eosinophil count. The 4% eosinophil cutoff point in the nasal lavage has better sensitivity and specificity indexes when differentiating allergic from non-allergic rhinitis.

The disadvantage of the nasal lavage technique is the fact that the recovered cells originate only from the nasal cavity lumen and do not necessarily reflect the epithelial tissue inflammatory process,<sup>40</sup> in which the reticular basement membrane thickening is used as a parameter for airway remodeling.<sup>9</sup>

Atopic subjects more frequently had some degree of epithelial lesion, but this finding was not associated with differences in the inflammatory process in the nasal cavity lumen when compared to non-atopic ones. Amin et al. reported loss of epithelial integrity associated with increased number of eosinophils, but not of neutrophils, in the nasal mucosa of patients with persistent allergic and non-allergic rhinitis.<sup>14</sup>

According to the findings by Lim et al., nasal secretion and nasal mucosa represent distinct compartments with different populations of leukocytes. After provocation tests with allergens, there was no epithelial destruction, basement membrane thickening or

subepithelial collagen deposition, as described in bronchial asthma.<sup>21</sup>

Few studies have investigated the structural remodeling in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis and the data are conflicting.<sup>36</sup> The presence and degree of basement membrane thickening may vary according to the assessed region. In the anterior region of the inferior turbinate, where the respiratory epithelium predominates, the proportion of basement membrane thickening is higher.<sup>31</sup> Because it is more exposed to airflow, where there is greater impact of aeroallergens and irritants, some aspects of the inflammatory process and remodeling findings may represent an adaptive response of the nasal mucosa, making it difficult to compare patients without and with rhinitis.<sup>14,31,33</sup>

Epithelial lesion, characterized by the presence of intercellular edema, epithelial desquamation and eosinophilic clusters, was demonstrated in the anterior nasal mucosa of patients allergic to dust mites.<sup>6,14,31</sup> In eight of the samples from the present study, areas of dysplastic epithelium and transitional to the non-keratinized squamous type were observed, also described by other authors.<sup>41,42</sup>

An increased number of eosinophils in the submucosa of patients with persistent severe allergic rhinitis is not always accompanied by changes in epithelial integrity and/or basement membrane thickening,<sup>36</sup> which may be associated with protective mechanisms that minimize remodeling and potentiate epithelial regeneration.<sup>41</sup>

However, when there is severe nasal obstruction due to persistent turbinate hypertrophy, the presence of subepithelial fibrosis has been described, as well as an association with symptom chronicity and little reversibility of the nasal airflow restriction.<sup>43</sup> Remodeling was also demonstrated in the nasal mucosa of patients with mild and severe intensity persistent allergic rhinitis, although with relatively intact epithelium, characterized by intense collagen deposition in the superficial and submucosal layers, in addition to significant basement membrane thickening, which could reflect the high levels of TGF- $\beta$  and its pro-fibrotic effect.<sup>44</sup>

Remodeling in allergic rhinitis, characterized by some degree of basement membrane thickening, without other alterations in the epithelium and submucosa,<sup>45</sup> may be related to collagen deposition.<sup>44,46</sup> The allergic inflammation potentiates and accelerates this physiological process of collagen deposition in the basement membrane of the inferior turbinate.<sup>7,47</sup>

The frequency of basement membrane thickening was similar between atopic (67%) and nonatopic (55%) subjects in our study. The proportion of eosinophils and neutrophils in the NL of atopic and non-atopic subjects was similar among those with BM thickening. On the other hand, the number of neutrophils in the nasal lavage of non-atopic subjects with basement membrane thickening was higher in comparison to NAT without BMT. This finding can associate the neutrophilic infiltration to the mucosal lesion mechanism in non-allergic patients. A similar number of eosinophils in the atopic and non-atopic NL samples, with basement membrane thickening, may also suggest the participation of eosinophils in the mucosal lesion of patients with allergic or non-allergic rhinitis.

Eosinophilic infiltration is the main cause of epithelial lesion, associated with loss of epithelial integrity in patients with allergic or non-allergic rhinitis.<sup>6,14,29,33</sup> In chronic

neutrophilic and eosinophilic rhinosinusitis, remodeling findings were similar, which also corroborates the concept that the occurrence of mucosal remodeling is independent of the type of inflammatory reaction.<sup>45</sup>

## Conclusion

These findings show that in patients with rhinitis, allergic or non-allergic, there are some differences in the inflammatory process, but they may result in similar structural damage to the nasal mucosa. If there is an association between the progression of the inflammatory process in the nasal cavity lumen and the histopathological mucosal lesion (thickening of the basement membrane), this association is independent of the presence of atopy in patients with rhinitis.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Anto JM, Bousquet J, Akdis M, Auffray C, Keil T, Momas I, et al. Mechanisms of the development of allergy (MeDALL): introducing novel concepts in allergy phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139:388–99.
2. Bourdin A, Neveu D, Vachier I, Paganin F, Godard P, Chanez P. Specificity of basement membrane thickening in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:1367–74.
3. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, Ait-Khaled N, Annesi-Maesano I, Bachert C, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:S147–336.
4. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1720–45.
5. Cruz AA, Popov T, Pawankar R, Annesi-Maesano I, Fokkens W, Kemp J, et al. Common characteristics of upper and lower airways in rhinitis and asthma: ARIA update, in collaboration with GA(2)LEN. *Allergy*. 2007;62 Suppl. 84:1–41.
6. Watanabe K, Kiuna C. Epithelial damage of nasal mucosa in nasal allergy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998;107:564–70.
7. Sanai A, Nagata H, Konno A. Extensive interstitial collagen deposition on the basement membrane zone in allergic nasal mucosa. *Acta Otolaryngol*. 1999;119:473–8.
8. Chanez P, Vignola AM, Vic P, Guddo F, Bonsignore G, Godard P, et al. Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:588–95.
9. Bousquet J, Jacquot W, Vignola AM, Bachert C, Cauwenberge PV. Allergic rhinitis: a disease remodeling the upper airways? *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:43–9.
10. Watelet JB, Van Zele T, Gjomarkaj M, Canonica GW, Dahlen SE, Fokkens W, et al. Tissue remodelling in upper airways: where is the link with lower airway remodeling? *Allergy*. 2006;61:1249–58.
11. Mori S, Pawankar R, Ozu C, Nonaka M, Yagi T, Okubo K. Expression and roles of MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1 and TIMP-2 in allergic nasal mucosa. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012;4:231–9.
12. Ciprandi G, Vizzaccaro A, Cirillo I, Tosca M, Massolo A, Pas-salacqua G. Nasal eosinophils display the best correlation with symptoms, pulmonary function and inflammation in allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;136:266–72.



13. Holmberg K, Bake B, Pipkorn U. Nasal mucosal blood flow after intranasal allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;81:541-7.
14. Amin K, Rinne J, Haahtela T. Inflammatory cell and epithelial characteristics of perennial allergic and nonallergic rhinitis with a symptom history of 1 to 3 years' duration. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:249-57.
15. Howarth PH, Persson CG, Meltzer EO, Jacobson MR, Durham SR, Silkoff PE. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115 Suppl. 1:S414-41. Matched ISSN: 0091-6749.
16. Chawes BLK. Upper and lower airway pathology in young children with allergic- and non-allergic rhinitis. *Dan Med Bull*. 2011;58. B4278.
17. Nair P, Goodwin S, Hargreave FE. Reproducibility, validity, and responsiveness of cell counts in blown nasal secretions. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2011;2:3-5.
18. Bascom R, Pipkorn U, Lichtenstein LM, Naclerio RM. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. Effect of systemic steroid pretreatment. *Am Rev Respir Dis*. 1988;138:406-12.
19. Cruz AA, Naclerio RM, Proud D, Togias A. Epithelial shedding is associated with nasal reactions to cold, dry air. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:1351-8.
20. Kovalhuk LCS, Rosário NA, Carvalho A. Mediadores inflamatórios, citograma em lavado nasal e tomografia computadorizada de seios paranasais em crianças atópicas. *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77:271-8.
21. Lim MC, Taylor RM, Naclerio RM. The histology of allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:136-44.
22. Meltzer EO. Evaluating rhinitis: clinical, rhinomanometric, and cytologic assessments. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;82:900-8.
23. Meltzer EO, Jalowayski AA, Vogt K, Iezzoni D, Harris AG. Effect of desloratadine therapy on symptom scores and measures of nasal patency in seasonal allergic rhinitis: results of a single-center, placebo-controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96:363-8.
24. Bernstein IL, Storms WW. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1995;75:543-625.
25. Rosário Filho NA, Baggio D, Suzuki MM. Ácaros na poeira domiciliar em Curitiba. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 1992;25:15-25.
26. Esteves PC, Rosário FNAR, Trippia SG, Caleffe LG. Sensibilidade atópica em escolares e adultos de Curitiba, Paraná. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 1999;22:156-60.
27. Dutra BMRS, Rosário F<sup>o</sup> NAR, Zavadniak AF. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2001;24:189-95.
28. Naclerio RM, Meier HL, Kagey-Sobotka A, Adkinson N, Meyers DA, Normam PS, et al. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Rev Respir Dis*. 1983;128:597-602. Matched ISSN: 0003-0805.
29. Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce G, Pronzato C, Ricca V, Parmiani S, et al. Minimal persistent inflammation is present at mucosal level in patients with asymptomatic rhinitis and mite allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96:971-9.
30. Lima WTA. Tratamento cirúrgico dos cornetos nasais. *Rev Bras Otorrinolaringol Cadern Debat (Suplem)*. 1998;64:5-10.
31. Augusto AGLBS, Bussolotti Filho I, Dolci JEL, König Júnior B. Estudo morfofuncional estrutural e ultra-estrutural da mucosa das regiões anteriores do septo e da concha inferior. *Braz J Otorhinolaryngol*. 1999;65:472-81.
32. Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Gaffey TA, Tarara JE, et al. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: is the histopathology similar to asthma? *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:877-82.
33. Salib RJ, Howarth PH. Remodelling of the upper airways in allergic rhinitis: is it a feature of the disease? *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1629-33.
34. Meltzer EO, Blaiss MS, Naclerio RM, Stoloff SW, Derebery MJ, Nelson HS, et al. Burden of allergic rhinitis: allergies in America, Latin America, and Asia-Pacific adult surveys. *Allergy Asthma Proc*. 2012;33 Suppl. 1:S113-41.
35. Rondón C, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, Durham SR, Powe DG, et al. Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1460-7.
36. Eifan AO, Orban NT, Jacobson MR, Durham SR. Severe persistent allergic rhinitis. Inflammation but no histologic features of structural upper airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:1431-9.
37. Raphael GD, Igarashi Y, White MV, Kaliner AK. The pathophysiology of rhinitis – sources of protein in allergen-induced nasal secretions. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88:33-42.
38. Braunstahl GJ, Overbeek SE, Kleinjan A, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:469-76.
39. Di Lorenzo G, Mansueto P, Pacor M, Martinelli N, Rizzo M, Ditta V, et al. Clinical importance of eosinophil count in nasal fluid in patients with allergic and non-allergic rhinitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009;22:1077-87.
40. Quirce S, Lemièrre C, De Blay F, Del Pozo V, Gerth VWR, Maestrelli P, et al. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy*. 2010;65:445-58.
41. Tulic MK, Hamid Q. Does airway remodelling occur in the upper airways of patients with allergic rhinitis? *Clin Exp Allergy*. 2010;40:1714-6.
42. Ishii J, Naito K, Miyata S, Senoh Y, Yokoyama N, Baba R. An electron microscopic study of the relation between epithelial cell damage and eosinophils in the nasal mucosa of patients with nasal allergy. *Arerugi*. 2000;49:1156-62.
43. Corren J, Togias A. Remodeling in allergic rhinitis. Adding new data to an old debate. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:1403-4.
44. Kim TH, Lee JY, Lee HM, Lee SH, Cho WS, Ju YH, et al. Remodelling of nasal mucosa in mild and severe persistent allergic rhinitis with special reference to the distribution of collagen, proteoglycans and lymphatic vessels. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:1742-54.
45. Samitas K, Carter A, Kariyawasam HH, Xanthou G. Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: the one airway concept revisited. *Allergy*. 2018;73:993-1002.
46. Agha-Mir-Salim P, Rauhut O, Merker HJ. Electron and fluorescence microscopic investigations on composition and structure of the epithelial basement membrane of the human inferior nasal concha. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1993;250:401-7.
47. Constantino GTL, Mello JF Jr. Remodelamento das vias aéreas inferiores e superiores. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75:151-6.

